

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

JÚLIA BRANDÃO GONTIJO

**Comunidades metanogênicas e metanotróficas em sedimentos de áreas
alagáveis da Amazônia Oriental**

Piracicaba

2017

JÚLIA BRANDÃO GONTIJO

**Comunidades metanogênicas e metanotróficas em sedimentos de áreas
alagáveis da Amazônia Oriental**

**Dissertação apresentada ao Centro de Energia
Nuclear na Agricultura da Universidade de São
Paulo, como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Ciências**

**Área de Concentração: Biologia na Agricultura e
no Ambiente**

Orientadora: Profa. Dra. Tsai Siu Mui

Piracicaba

2017

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Gontijo, Júlia Brandão

Comunidades metanogênicas e metanotróficas em sedimentos de áreas alagáveis da Amazônia Oriental / Júlia Brandão Gontijo; orientadora Tsai Siu Mui. - - Piracicaba, 2017.

72 p.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Biologia molecular 2. Ciclo do metano 3. Ecologia microbiana 4. Genes funcionais 5. qPCR 6. Sequenciamento 16S rRNA I. Título

CDU 579.26 : 547.211

Dedico...

Aos meus pais, Celeste e Rinaldo, pela compreensão da distância e apoio para seguir em frente.

Agradeço...

Agradeço primeiramente à Deus, por minha família, amigos, sonhos e proteção;

À minha orientadora, Professora Tsai Siu Mui, por todas oportunidades a mim oferecidas. Também por todos os momentos de descontração, além de, muitas vezes, cumprir o papel de “mãe de Piracicaba”;

Aos meus amados pais, Celeste e Rinaldo, por abrirem mão da minha presença para que eu pudesse correr atrás dos meus sonhos;

Ao meu namorado, Gustavo, por ser parte fundamental da minha vida pessoal e profissional. Aprendemos juntos a lidar com a distância e saudade...;

À minha grande família, incluindo irmãos, cunhadas, sobrinha, avós, primos, tios, e sogros, pelo carinho e apoio, sempre;

Aos meus amigos “de Minas”, Raíssa, Helena, Reges, Júnia e Bruno, que mesmo a distância geográfica não é capaz de diminuir o carinho que sinto por vocês!;

Aos colegas do Laboratório de Biologia Celular e Molecular e agregados, Acácio, Alexandre, Bia, Carol, Clovis, Dani, Dasiel, Diego, Enéas, Elisa, Fabi, Gabi, Giampaolo, Jéssica, Juanita, Juliana, Juliane, Leandro Fonseca, Lucas Mendes, Lucas Oliveira, Lucas Palma, Lucas IV, Luis, Marcos, Mariana, Mariley, Míriam, Naissa, Patrícia, Rafaela, Sâmela, Sara, Sheila e Tayná, pela boa convivência no laboratório;

Ao amigo Leandro Lemos, pela ajuda com as análises de bioinformática!!!!!!!!!!;

Aos amigos Aline, Andressa, Caio e Fernanda, por me acolherem no lab e me apoiarem em todos os momentos de dificuldade ao longo dessa caminhada. Vocês fizeram dessa jornada um caminho mais leve e divertido!;

Aos técnicos do Laboratório, Wagner (não teria minhas amostras sem você!) e Fábio, pela solicitude em cada etapa dessa jornada;

Ao professor José Mauro (UFOPA) pelo apoio durante o mestrado;

A todos os funcionários do CENA, em especial aos da secretaria de Pós-Graduação, à Soninha e à Marília da Biblioteca, por toda ajuda com processos, organização de datas e correção da dissertação;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (133769/2015-1), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (2014/50320-4) e à Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz – FEALQ, pelos auxílios financeiros e bolsas concedidas;

Enfim, agradeço a todos que, de alguma forma, fizeram parte dessa caminhada até aqui.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

Isaac Newton

RESUMO

GONTIJO, J. B. **Comunidades metanogênicas e metanotróficas em sedimentos de áreas alagáveis da Amazônia Oriental**. 2017. 72 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

As áreas alagáveis naturais representam a mais importante fonte não-antropogênica de metano (CH_4), com emissões estimadas entre 177 a 284 Tg ano⁻¹, representando de 26 a 42% das emissões globais de CH_4 . A bacia do Rio Amazonas cobre uma grande porção dos trópicos úmidos, e a rede de drenagem deste rio excede a extensão de mais de um milhão de quilômetros quadrados. As grandes várzeas da bacia Amazônica são as maiores fontes naturais de CH_4 desta região e estima-se que sua contribuição para as emissões totais de áreas alagadas no mundo seja na ordem de 5%. O CH_4 produzido nas zonas anaeróbicas dos sedimentos por arqueias metanogênicas pode ser oxidado a CO_2 pelos microrganismos metanotróficos. Com base na hipótese de que o fluxo de CH_4 se altera sazonalmente em áreas alagáveis e que a microbiota presente está diretamente relacionada a esse processo, o presente estudo teve como objetivo geral avaliar a dinâmica dos genes funcionais envolvidos no ciclo do CH_4 em épocas contrastantes, correlacionando com o fluxo do gás, variáveis ambientais e perfil taxonômico de *Bacteria* e *Archaea* em sedimentos de três áreas alagáveis e solo de floresta primária, da Amazônia Oriental (Belterra e Santarém-PA). Foram realizadas amostragem de gases, sedimentos e solo em duas épocas contrastantes (maio e outubro de 2016 – cheia e seca), para determinação da concentração de CH_4 retido no sedimento durante a época cheia, cálculo do fluxo de CH_4 durante a época seca, análises físico-químicas e extração de DNA dos sedimentos e solo para realização da qPCR dos genes funcionais *mcrA* e *pmoA* e dos genes marcadores filogenéticos 16S rRNA de *Bacteria* e *Archaea*, e sequenciamento do gene 16S rRNA de *Bacteria* e *Archaea*. A partir das amostragens de gases, foi possível observar que as áreas alagáveis possuem potencial de atuarem como fonte de CH_4 durante a época cheia, e como fonte ou dreno de metano durante a época seca, confirmado pelas análises de qPCR, uma vez que a abundância do gene *pmoA* aumenta durante a época seca. Já no solo de floresta, o gene *mcrA* foi considerado como não detectado, portanto, a floresta pode ser considerada somente como potencial dreno de CH_4 . O estimador ACE e o índice Shannon mostraram que os sedimentos de áreas alagáveis possuem maior riqueza e diversidade de *Bacteria* e *Archaea* quando comparados ao solo de floresta. Todas as áreas apresentaram perfis taxonômicos do domínio *Bacteria* semelhantes, porém, a grande diferença entre as comunidades está relacionada ao domínio *Archaea*. A comunidade de arqueias no solo de floresta é majoritariamente composta por representantes do filo *Thaumarchaeota*. O solo de floresta apresentou baixa abundância dos filotipos potencialmente produtores de CH_4 , *Bathyarchaeota* e *Euryarchaeota*, e o contrário foi observado nas áreas alagáveis. Os dados gerados no presente estudo incentivam a continuidade de trabalhos relacionados ao ciclo do CH_4 em áreas alagáveis da bacia Amazônica, incluindo investigações acerca do papel do filo *Bathyarchaeota* nessas áreas, principalmente em relação ao ciclo do CH_4 .

Palavras-chave: Ecologia microbiana. Metanogênese. Metanotrofia. Ciclo do metano. qPCR. Sequenciamento de amplicon.

ABSTRACT

GONTIJO, J. B. **Methanogens and methanotrophs communities in sediments of Eastern Amazonian wetlands**. 2017. 72 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

Natural wetlands represent the most important non-anthropogenic source of methane (CH₄), with emissions estimated of 177-284 Tg year⁻¹, accounting for 26-42% of global CH₄ emissions. The Amazon basin covers a large portion of the humid tropics, and the drainage network of this river exceeds the extent of more than one million square kilometers. The wetlands of the Amazon basin are the largest natural sources of CH₄ in this region and it is estimated that their contribution to the total emissions of wetlands in the world is around 5%. The CH₄ produced in the anaerobic zones of the sediments by methanogenic archaea can be oxidized to CO₂ by the methanotrophic microorganisms. Based on the hypothesis that methane flux changes seasonally in wetlands and its microbiota is directly related to this process, this research has the main objective to evaluate the dynamics of the functional genes involved in the CH₄ cycle in contrasting seasons, correlating with the CH₄ flux, environmental variables and taxonomic profile of *Bacteria* and *Archaea* in three wetlands and one primary forest of the Eastern Amazon (Belterra and Santarém-PA). The sampling of gas, sediments and soil was performed in May and October 2016 (wet and dry seasons) to determine the concentration of CH₄ retained in the sediment in the wet season, measurement of CH₄ flux in the dry season, physicochemical properties and molecular analysis (qPCR of the *mcrA*, *pmoA* functional genes and phylogenetic marker genes 16S rRNA of *Bacteria* and *Archaea* and sequencing of the 16S rRNA gene of *Bacteria* and *Archaea*). From gas samplings, it was possible to observe that wetlands have the potential to act as source of CH₄ during the wet season, and as a source or drain of CH₄ during the dry season, confirmed by qPCR analyzes, due the abundance increases of the *pmoA* gene during the dry season. In the forest soil, the *mcrA* gene was not detected, therefore, the forest could be considered only as CH₄ drain potential. The ACE estimator and the Shannon index showed that the sediments of wetlands have higher richness and diversity of *Bacteria* and *Archaea* when compared to the forest soil. All areas presented similar taxonomic profiles of *Bacteria*, however, the main difference between the communities is related to the *Archaea*. The archaeal community in the forest soil is mostly composed of representatives of the phylum *Thaumarchaeota*. The forest soil presented low abundance of the phyla with potential CH₄ producers, *Bathyarchaeota* and *Euryarchaeota*, however the opposite was observed in the wetlands. The data generated in the present study encourage the continuity of work related to the CH₄ cycle in wetlands of the Amazon basin, including investigations about the role of the *Bathyarchaeota* phylum in these areas, especially in relation to the CH₄ cycle.

Keywords: Microbial ecology. Methanogenesis. Methanotrophy. Methane cycle. qPCR. Amplicon sequencing.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 Áreas alagáveis da Amazônia.....	17
2.2 Ciclo biogeoquímico do metano em áreas alagáveis.....	19
2.2.1 Arqueias metanogênicas.....	20
2.2.2 Microrganismos metanotróficos.....	22
2.3 Abordagens moleculares para estudos em ecologia microbiana.....	24
2.3.1 PCR quantitativo em tempo real.....	25
2.3.2 Sequenciamento em larga escala do gene 16S rRNA.....	26
3 HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	28
3.1 Hipótese.....	28
3.2 Objetivo geral.....	28
3.2.1 Objetivos específicos.....	28
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 Área de Estudo.....	29
4.2 Amostragens.....	32
4.2.1 Coleta e processamento amostras de sedimentos e solo.....	32
4.2.1.1 Análise físico-química das amostras de sedimentos e solo.....	33
4.2.1.2 Determinação da umidade das amostras de sedimentos e solo.....	33
4.2.2 Coletas do gás metano (CH ₄).....	34
4.3 Extração de DNA de sedimentos e solo.....	35
4.4 PCR quantitativo em tempo real.....	36
4.4.1 Gene <i>mcrA</i>	36
4.4.2 Gene <i>pmoA</i>	37
4.4.3 Gene 16S rRNA <i>Bacteria</i>	39
4.4.4 Gene 16S rRNA <i>Archaea</i>	40
4.5 Sequenciamento em larga escala dos genes 16s rRNA de <i>Bacteria</i> e <i>Archaea</i>	41
4.6 Análises dos dados.....	41

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 Propriedades físico-químicas dos sedimentos e solo	43
5.2 Coletas de gás metano (CH ₄)	45
5.3 DNA genômico dos sedimentos e solo	48
5.4 PCR quantitativo em tempo real	49
5.4.1 Genes funcionais <i>mcrA</i> e <i>pmoA</i>	49
5.4.2 Genes 16S rRNA de <i>Bacteria</i> e <i>Archaea</i>	52
5.5 Sequenciamento em larga escala dos genes 16s rRNA de <i>Bacteria</i> e <i>Archaea</i>	55
5.5.1 Estimativas de riqueza e medidas de diversidade	55
5.5.2 Perfis taxonômicos das comunidades de <i>Bacteria</i> e <i>Archaea</i>	57
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

Os gases de efeito estufa (GEEs) encontrados na atmosfera, como dióxido de carbono (CO_2), vapor d'água, metano (CH_4) e óxido nitroso (N_2O) têm a capacidade de absorver a radiação solar infravermelha (calor) que é refletida pela superfície terrestre. Esse fenômeno é conhecido como efeito estufa, importante para a regulação da temperatura no planeta, permitindo a vida. No entanto, desde a revolução Industrial, o aumento na produção destes gases, principalmente a partir da queima de combustíveis de origem fóssil para geração de energia, tem levado a uma tendência de aumento das temperaturas globais (HOUGHTON, 2005). As mudanças climáticas são inequívocas e inevitáveis (IPCC, 2013). Desde a década de 1950, a temperatura média global aumentou em $0,72^\circ\text{C}$ e prevê-se um aumento adicional de $1,5$ a $4,5^\circ\text{C}$ até ao final deste século (IPCC, 2013).

A concentração atmosférica do CH_4 aumentou gradativamente ao longo das últimas décadas, atualmente em $1,8$ ppm por volume (ppmv), e continua a subir após uma aparente estagnação no início da década de 2000 (DLUGOKENCKY et al., 2009). Por possuir o potencial de aquecimento global 25 vezes maior que o CO_2 , o CH_4 aquece a atmosfera em uma perspectiva de 100 anos mais do que o dióxido de carbono, e assim, sua crescente concentração atmosférica contribui para o aquecimento global (IPCC, 2013).

As áreas alagáveis naturais representam a mais importante fonte não-antropogênica de CH_4 , com emissões estimadas entre 177 a 284 Tg ano⁻¹, representando de 26 a 42% das emissões globais de CH_4 (CIAIS et al., 2014). A bacia do Rio Amazonas cobre uma grande porção dos trópicos úmidos, e a rede de drenagem deste rio excede a extensão de mais de um milhão de quilômetros quadrados (JUNK, 1997). As grandes várzeas da bacia Amazônica são as maiores fontes naturais de CH_4 desta região e estima-se que sua contribuição para as emissões totais de áreas alagadas no mundo seja na ordem de 5% (DEVOL et al., 1990).

O ciclo do CH_4 nesses ambientes é conduzido por microrganismos: as arqueias metanogênicas geram CH_4 nas zonas anóxicas do sedimento como a etapa final da degradação anaeróbia da matéria orgânica, utilizando hidrogênio ou dióxido de carbono (CO_2), acetato ou pequenos compostos metilados como substrato. Por outro lado, uma quantidade substancial de CH_4 gerado nas zonas anóxicas das áreas alagáveis é oxidado antes que ele possa atingir a atmosfera por meio de bactérias metano-oxidantes aeróbias (metanotróficas), que são ativas principalmente na interface óxico-anóxica (WHALEN, 2005; CONRAD, 2009; NAZARIES et al., 2013).

Portanto, o estudo dessas comunidades metanogênicas e metanotróficas em áreas alagáveis da Amazônia, dada a grande contribuição dessas áreas para o balanço regional e global do carbono, representa um importante passo para o entendimento da dinâmica do ciclo biogeoquímico do CH₄ nessa região.

2 REVISÃO DE LITERATURA

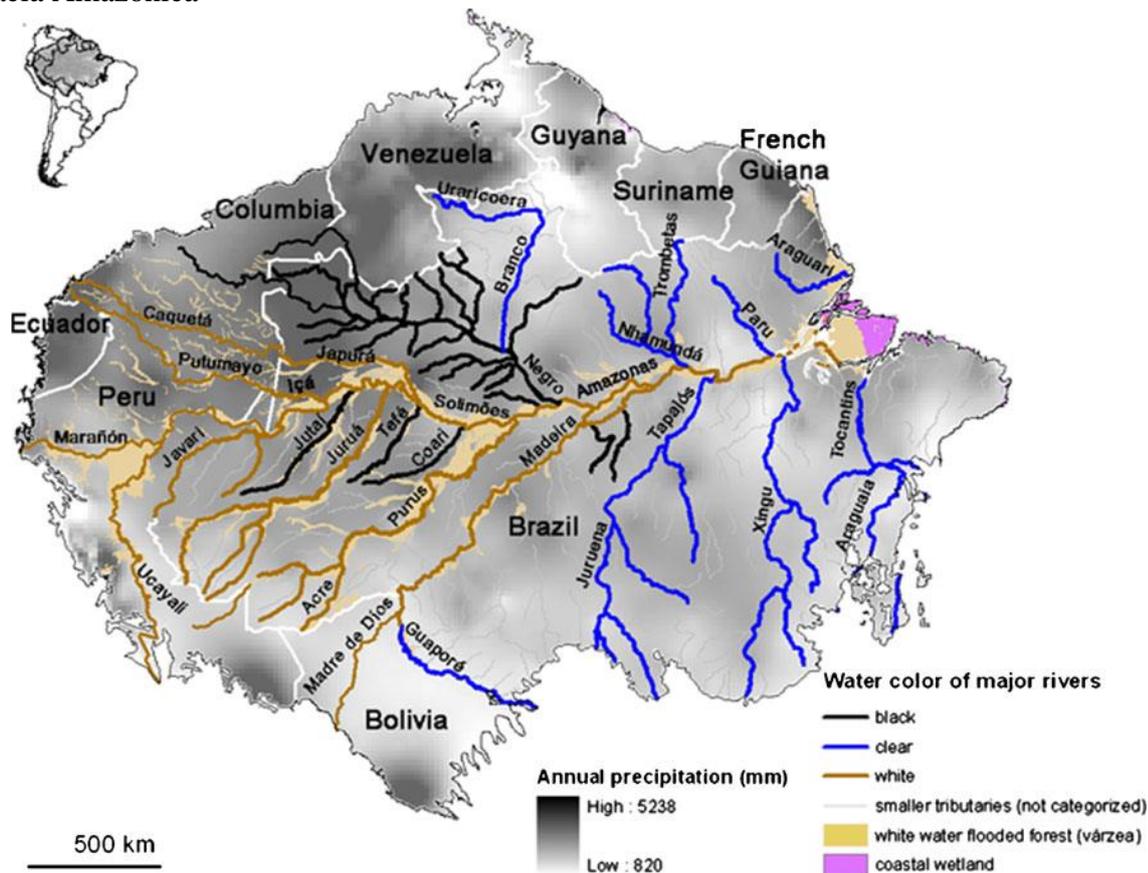
2.1 Áreas alagáveis da Amazônia

A Floresta Amazônica desempenha um papel essencial nos processos ecológicos globais, mantendo os maiores rios de água do doce do mundo, controlando a temperatura atmosférica e precipitação, e balanceando o fluxo de gases atmosféricos. Está situada na Linha do Equador, sendo 68% da área situada no Brasil e o restante dividido entre Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Peru, Suriname e Guiana (JUNK et al., 2011).

Ao longo da Bacia Amazônica, a elevada precipitação anual é distribuída de forma irregular entre as estações chuvosa e seca, o que causa oscilações na vazão dos rios, resultando em extensas áreas sazonalmente inundadas. Além disso, como grandes áreas da Bacia Amazônica são planas e a rede de córregos drena o excesso de água da chuva lentamente, muitas áreas interfluviais também se tornam encharcadas durante a estação chuvosa. Quando ocorre a inundação, além dos sedimentos, as águas dos rios lançam enorme quantidade de nutrientes em suas planícies aluviais, o que torna o solo muito fértil para o plantio (JUNK et al., 2012). As áreas alagáveis da Amazônia constituem um ecossistema de paisagem diversificada e dinâmica que há milhares de anos tem sido ocupado por populações humanas.

As populações pré-colombianas classificaram os rios pela cor da água, refletindo nos nomes de rios como Rio Claro, Rio Preto, Rio Negro, Rio Branco, e Rio Verde, por exemplo. A primeira classificação científica dos corpos d'água amazônicos foi elaborada na década de 1950 por Sioli (1956), utilizando a cor de água, bem como parâmetros físicos e químicos, para explicar características limnológicas dos grandes rios amazônicos e relacionar essas características com as propriedades geológicas e geomorfológicas de suas bacias hidrográficas (Figura 1).

Figura 1 - Distribuição dos principais rios de águas brancas, águas pretas e águas claras na Bacia Amazônica



Fonte: JUNK et al. 2011.

Os rios de águas brancas (como por exemplo, Amazonas, Juruá, Japurá, Purus e Madeira) originam-se nos Andes e transportam grandes quantidades de sedimentos ricos em nutrientes. Suas águas têm pH quase neutro e concentrações relativamente altas de sólidos dissolvidos (principalmente metais alcalinos e carbonatos). Os rios de águas brancas depositam seus sedimentos em grandes áreas que são localmente chamadas de várzeas ou igarapés, considerados férteis e habitats de diversas comunidades de plantas herbáceas terrestres e aquáticas (JUNK et al., 2011).

Os rios de águas pretas (como o rio Negro) são transparentes e cristalinos quando vistos em lugares rasos, com baixas quantidades de matéria em suspensão e altas quantidades de ácidos húmicos, responsáveis pela cor marrom-café da água. O fundo desses rios é caracterizado pela presença de areia branca e os valores de pH variam entre 4 a 5. As áreas alagáveis de rios de águas pretas são de baixa fertilidade e são chamadas localmente igapós. Eles são cobertos por uma floresta de várzea de crescimento lento em que a produção de serapilheira é aproximadamente 30% menor (FURCH; JUNK, 1997) e as taxas de

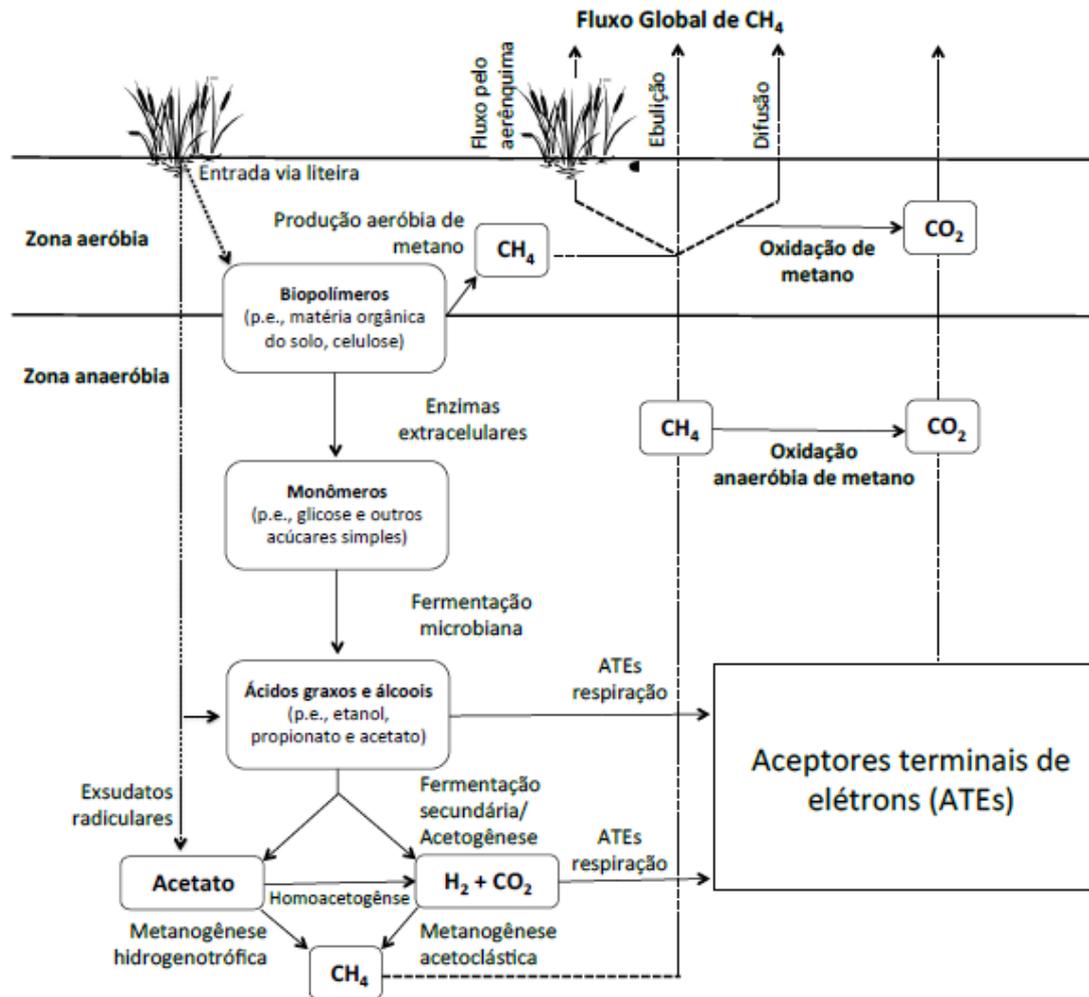
crescimento de incremento de diâmetro das árvores são até dois terços menores do que as encontradas em várzeas (SCHÖNGART et al., 2010).

Os rios de águas claras (como os rios Tapajós, Xingu e Tocantins) têm suas bacias hidrográficas superiores na região de cerrado do Brasil Central. Suas águas são transparentes e esverdeadas com baixas quantidades de sedimentos e sólidos dissolvidos e um pH ácido que varia entre 5 e 6 em grandes rios. As áreas alagáveis dos rios de águas claras são de fertilidade baixa a intermediária, também denominadas igapós e igarapés (JUNK et al., 2011; JUNK et al., 2013).

2.2 Ciclo biogeoquímico do CH₄ em áreas alagáveis

Os sedimentos fluviais são um exemplo único de ecossistema, afetado pela disponibilidade flutuante de matéria orgânica proveniente principalmente do ambiente terrestre circundante (CHAUDHARY et al., 2017). Devido a sua enorme área (cerca de 900 mil km²), as zonas úmidas na bacia Amazônica exercem um papel importante nos ciclos hidrológicos e biogeoquímicos, contribuindo significativamente para o balanço regional e global do carbono (CRILL et al., 1988; MOREIRA-TURCQ et al., 2003).

O CH₄ é um produto final do processo de respiração anóxica que ocorre principalmente pelo uso de ácido acético (por arqueias metanogênicas acetoclásticas) e hidrogênio e dióxido de carbono (por arqueias metanogênicas hidrogenotróficas) (FENCHEL et al., 2012; BRIDGHAM et al., 2013) (Figura 2), podendo ocorrer, em menor escala, por outras vias. No período de cheia, sedimentos ricos em matéria orgânica e geralmente com baixas concentrações de aceptores alternativos de elétrons apresentam condições anóxicas favoráveis à produção de CH₄. A decomposição do sedimento é responsável por 80% do CH₄ emitido dessas áreas na Amazônia (DEVOL et al., 1994). O CH₄ pode deixar a coluna d'água através de difusão, ebulição (libertação de bolhas) e/ou transporte mediado por plantas (BRIDGHAM et al., 2013). A solubilidade do CH₄ em água é muito baixa e rapidamente forma bolhas, portanto, a ebulição se apresenta como a principal via de emissão do gás em condições de alagamento (OSTROVSKY et al., 2008).

Figura 2 - Ciclo do CH₄ em áreas alagáveis

Fonte: Adaptado de Bridgham et al., 2013.

Sawakuchi et al. (2016) estimaram que cerca de 7% do CH₄ gerado no sedimento pode ser consumido por bactérias metanotróficas na bacia Amazônica. A maneira como a composição e a dinâmica das comunidades microbianas metanogênicas e metanotróficas - importante controle potencial da produção de CH₄ - afetam a produção de CH₄ em pequena e larga escala deve ser considerada para entender melhor a variabilidade espacial e temporal na produção de CH₄ em áreas alagáveis (TORRES-ALVARADO et al., 2005; BRIDGHAM et al., 2013).

2.2.1 Arqueias metanogênicas

O Domínio *Archaea* é caracterizado por microrganismos evolutivamente distintos dos microrganismos alocados no Domínio *Bacteria* em função das características de organização do genoma, expressão gênica, composição celular e filogenia (CANHOS; VAZOLLER,

1999). Os primeiros microrganismos pertencentes ao Domínio *Archaea* foram isolados de ambientes inóspitos ou nichos ecológicos especializados, sob condições semelhantes às aquelas encontradas na origem da Terra (BINTRIM et al., 1997). Por esta razão, estes microrganismos foram considerados primitivos, e denominados originalmente de “arqueobactérias”. Essa denominação foi abandonada em 1990, por sugerir erroneamente a relação entre os Domínios *Archaea* e *Bacteria* (WOESE et al., 1990). Estudos de filogenia molecular veem mostrando que as arqueias são muito mais diversas e largamente distribuídas que os primeiros membros cultivados, restritos a ambientes extremos (PAZINATO et al., 2010).

Geralmente, as arqueias constituem apenas uma pequena fração da comunidade microbiana total em solos e sedimentos, apesar de suas grandes contribuições aos processos biogeoquímicos em todo o ecossistema (BATES et al., 2011; BORREL et al., 2012; NARROWE et al., 2017). As arqueias metanogênicas são o único grupo de microrganismos que, devido a sistemas enzimáticos específicos, é capaz de produzir CH₄ a partir de seu metabolismo. São encontradas em diversos ambientes associadas à decomposição da matéria orgânica e/ou atividades biogeoquímicas (ZINDER, 1998; NARIHIRO; SEKIGUCHI, 2011). Apesar da grande variedade de características encontradas entre as metanogênicas, todas têm em comum o estilo de vida anaeróbio e a habilidade de produzir CH₄.

As arqueias metanogênicas estão distribuídas em sete ordens do filo *Euryarcheota*: *MethanoBacteriales*, *Methanocellales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanoplasmatales*, *Methanopyrales* e *Methanosarcinales* (HOFMANN et al., 2016). Recentemente, Evans et al. (2015) recuperaram genomas de duas linhagens do filo *Bathyarchaeota* em um aquífero Australiano, encontrando genes responsáveis pela produção e oxidação anaeróbica de CH₄ homólogos aos genes presentes no filo *Euryarcheota*, porém filogeneticamente divergentes, evidenciando a necessidade de mais estudos relacionados a detecção, identificação e metabolismo de arqueias metanogênicas.

A especialidade catabólica é característica fisiológica importante das arqueias metanogênicas. Por metabolizarem uma gama restrita de compostos, tais como o CO₂, acetato e compostos que contem grupos metil, a metanogênese ocorre somente em sintrofia com outros microrganismos degradadores de compostos complexos em substratos simples de carbono, permitindo que sejam utilizados pelas arqueias metanogênicas (NAKAYAMA et al., 2011; SERRANO-SILVA et al., 2014). A maioria das arqueias metanogênicas é mesofílica, capazes de produzir CH₄ em temperaturas variando de 20 °C a 40 °C. Poucos gêneros de arqueias metanogênicas podem ser encontrados em ambientes extremos, como sedimentos hipersalinos, fontes termais e sedimentos geotérmicos, onde

podem se desenvolver a temperaturas acima de 100 °C (NAZARIES et al., 2013). Com base no substrato que utilizam, os metanógenos são classificados em cinco grupos (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação dos grupos tróficos de arqueias metanogênicas

Substratos	Produtos	Grupos Tróficos
$4\text{H}_2 + \text{CO}_2$	$\text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$	Hidrogenotrófico
4HCOOH	$\text{CH}_4 + 3\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	Formatotrófico
Acetato	$\text{CH}_4 + \text{CO}_2$	Acetoclástico
$4\text{CH}_3\text{OH}$	$3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	Metilotrófico
$\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3 + \text{CO}_2$	$\text{CH}_4 + 4\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3 + 2\text{H}_2\text{O}$	Alcootrófico

Fonte: Adaptado de Maylan et al. (2016).

No processo de geração de CH_4 , a metil-coenzima M redutase possui papel essencial na metanogênese, uma vez que está presente na última etapa da geração do CH_4 . O gene *mcrA* codifica a subunidade alfa desta coenzima e está presente exclusivamente nas arqueias metanogênicas (ARONSON et al., 2013). Por ser conservado, o gene *mcrA* é utilizado como base para os métodos independentes de cultivo, sendo importante marcador funcional, possibilitando a detecção, quantificação e classificação de arqueias metanogênicas em diferentes ambientes (LUTON et al., 2002).

2.2.2 Microrganismos metanotróficos

O processo de oxidação biológica CH_4 pode ser realizado tanto aeróbia quanto anaerobicamente. As bactérias metanotróficas aeróbias pertencem aos filos *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia*, caracterizadas por serem gram-negativas e apresentarem grande diversidade de formas e metabolismos. Os gêneros de metanotróficas conhecidos e pertencentes ao filo *Proteobacteria* estão divididos em dois tipos: tipo I, pertencentes à subdivisão *Gammaproteobacteria*, e tipo II, pertencentes à subdivisão *Alphaproteobacteria* (HANSON; HANSON, 1996; CONRAD, 2007; SEMRAU et al., 2010).

Bactérias metilotróficas geralmente utilizam CH_4 ou metanol como fonte de energia para o seu crescimento (SEMRAU et al., 2010; HANSON; HANSON, 1996). Já as bactérias metanotróficas obrigatórias utilizam apenas CH_4 como e fonte de C e energia (DEDYSH; DUNFIELD, 2011). A disponibilidade de oxigênio é o principal fator limitante para a metanotrofia aeróbia, sendo a maioria mesófilos e neutrofílicos, com crescimento máximo entre 20 °C e 40 °C e pH 6 a 8, respectivamente (BODEGOM et al., 2001; MAYLAN et al., 2016).

Na oxidação aeróbia, o CH₄ é convertido em CO₂ pela atividade enzimática sequencial. No primeiro passo, a metano monooxigenase (MMO) converte CH₄ em CH₃CHO, que em seguida é oxidado a formaldeído pela metanol-desidrogenase e, por fim, oxidado para CO₂, como apresentado a seguir:



Fonte: Adaptado de Maylan et al. (2016).

As enzimas metano monooxigenases (MMO) catalisam o processo de oxidação aeróbia de CH₄. São conhecidas duas formas da enzima MMO; uma forma particulada (pMMO), presente na membrana celular de todas as metanotróficas, codificada pelo gene funcional *pmoA* em metanotróficas tipo I; e uma forma solúvel citoplasmática (sMMO), encontrada apenas em algumas espécies, codificada pelo gene funcional *mmoX* em metanotróficas tipo II (DEDYSH et al., 2000; SEMRAU et al., 2010).

Ambas as formas de enzimas MMO requerem oxigênio para o processo de oxidação (HAKEMAIN; ROSENZWEIG, 2007). A enzima pMMO contém ferro e cobre, enquanto que sMMO contém um único local de di-ferro no seu centro catalítico (CHOWDHARY; DICK, 2013). A enzima sMMO é capaz de oxidar uma vasta gama de compostos alifáticos, aromáticos e alcanos (COLBY et al., 1977). O pMMO está presente em todos os metanotróficos, exceto *Methyloferula* e *Methylomonas* spp. (VOROBEBV et al., 2011). As espécies *Methylomonas* e *Methyloferula* são metanotróficos facultativos que utilizam sMMO para crescer em CH₄. Além de CH₄, estas espécies também crescem em outros compostos multi-carbono como acetato, etanol, malato, succinato e piruvato (RAHMAN et al., 2011).

Já o mecanismo de oxidação anaeróbia de CH₄ é realizado por associação física de arqueias metanotróficas anaeróbias e bactérias redutoras de sulfato (NAZARIES et al., 2013; CHOWDHARY; DICK, 2013; SERRANO-SILVA et al., 2014). Essa associação permite a oxidação de CH₄ a CO₂ utilizando sulfato como aceptor de elétrons, de modo que o processo também é chamado de oxidação de CH₄ dependente de sulfato ou metanogênese reversa (CALDWELL et al., 2008; THAUER; SHIMA, 2008). Os detalhes do mecanismo de oxidação anóxica do CH₄ ainda são desconhecidos, porém, aparentemente, os metanotróficos primeiro ativam, de alguma forma, o CH₄, para então oxidá-lo a CO₂ pela reversão das etapas de metanogênese (MADIGAN et al., 2014).

2.3 Abordagens moleculares para estudos em ecologia microbiana

A ecologia microbiana é uma ciência que tem como objetivo compreender como as comunidades microbianas interagem entre si e com o ambiente (SANTOS, 2010). Os principais componentes desta ciência são a diversidade e a atividade microbiana. Atualmente, os estudos em ecologia microbiana permitem responder, por exemplo, quais fatores influenciam a diversidade e quão estáveis às comunidades microbianas se apresentam no ambiente (QUINTAES et al., 2012).

Rosado e Duarte (2002) afirmaram que a diversidade microbiana é tão vasta quanto desconhecida. Sabe-se que um pequeno percentual das espécies microbianas do planeta foi identificado, deixando vasta porção dessa biota desconhecida e não estudada. A utilização de metodologias de cultivo impõe às populações microbianas uma pressão seletiva, impedindo a detecção de muitos microrganismos “não cultiváveis”, fazendo com que o estudo da diversidade associada a determinado ambiente com a utilização de meios de cultivo seletivos a grupos particulares seja bastante limitado (ZAK et al., 1994; COUTINHO et al., 1999; SANTOS et al., 2009).

A evolução da biologia molecular nas últimas décadas propiciou avanços nos estudos da microbiologia ambiental e da ecologia microbiana. A ecologia microbiana molecular é baseada na análise de moléculas representativas de organismos (proteínas, enzimas, ou ácidos nucleicos) ou de processos por eles desencadeados (SANTOS, 2010). A principal razão para o uso de técnicas independentes do cultivo está relacionada à dificuldade para se desenvolverem meios de cultura adequados que simulem condições ideais de crescimento dos microrganismos de interesse (ERCOLINI, 2004).

Genes específicos frequentemente estão associados a organismos específicos, que podem ser utilizados como medida de biodiversidade a partir, por exemplo, da detecção desse gene de interesse em amostras ambientais (MADIGAN et al., 2014). A extração de DNA de amostras ambientais, com posterior amplificação e análise do material genético, tem sido uma alternativa ou complemento ao método clássico de cultivo e análises fisiológicas de microrganismos (ZILLI et al., 2003; ERCOLINI, 2004). Os métodos moleculares, independentes de cultivo, em geral utilizam, como etapa inicial, a amplificação de genes marcadores pela Reação da Polimerase em Cadeia (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*). Após a extração do DNA total de uma dada amostra, o material extraído serve como molde para a reação de PCR. A região a ser amplificada deverá conter sequências conservadas que irão permitir o pareamento dos iniciadores, e regiões variáveis que serão utilizadas pela filogenia (YE et al., 2012).

2.3.1 PCR quantitativo em tempo real

Embora a PCR tenha revolucionado a detecção de ácidos nucleicos, a aplicação em análises quantitativas geralmente não é recomendada porque a PCR convencional só pode medir a concentração final da sequência alvo, que é amplificada exponencialmente durante a PCR. No entanto, a concentração final não é proporcional à concentração inicial do DNA (ZHANG; FANG, 2006). Contrariamente à PCR convencional, a PCR quantitativa em tempo real (qPCR) pode monitorar o progresso da amplificação do DNA em tempo real e visualizar a fase de amplificação exponencial. Este monitoramento em tempo real, que é a chave para a quantificação absoluta de sequências alvo, é conseguida medindo continuamente a fluorescência emitida à medida que as sequências-alvo se acumulam. A qPCR tem sido amplamente utilizada como ferramenta para detectar e quantificar microrganismos de interesse em estudos de ecologia microbiana (KIM et al., 2013).

Existem várias químicas de detecção disponíveis que envolvem várias moléculas fluorescentes, e, embora cada método de detecção tenha características únicas em todos os métodos, o nível de sinal de fluorescência reflete a quantidade cumulativa de sequências-alvo (LIM et al., 2011). Entre as várias químicas de detecção, a utilização de SYBR[®] Green é uma das mais difundidas. O SYBR[®] Green se liga entre a fita dupla de DNA e com a excitação da luz emitida pelo sistema ótico do termociclador, emite uma fluorescência verde, possibilitando, ao final de cada ciclo de amplificação, a determinação relativa ou absoluta do DNA amplificado.

No início da amplificação, a reação contém o DNA desnaturado, os iniciadores e o SYBR[®] Green. As moléculas não-ligadas ao SYBR[®] Green apresentam fluorescência fraca produzindo um sinal mínimo sendo este subtraído pelo próprio equipamento. Após o reconhecimento dos iniciadores, algumas moléculas do SYBR[®] Green podem ligar-se na fita dupla previamente formada. Durante a polimerização catalisada pela enzima Taq DNA polimerase, as moléculas do SYBR[®] Green vão se ligando ao DNA recentemente sintetizado. Assim, a reação é monitorada continuamente e um aumento da fluorescência é observado em tempo real. A detecção da fluorescência no fim da etapa de extensão de cada ciclo da PCR permite monitorar a quantidade crescente de DNA amplificado (VITZTHUM et al., 1999; NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

As vantagens da utilização do SYBR[®] Green são: baixo custo, facilidade no uso e sensibilidade. A desvantagem é a ligação em todo DNA fita dupla que surge durante a reação, incluindo os dímeros dos iniciadores e outros produtos inespecíficos, podendo superestimar a concentração do fragmento alvo (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

A qPCR é altamente sensível, precisa e permite a análise de várias amostras e o uso de diferentes genes funcionais simultaneamente num mesmo estudo. Essa técnica é amplamente utilizada em estudos relacionados ao ciclo do CH₄, sendo possível, por exemplo, correlacionar a abundância dos genes funcionais relacionados à metanogênese e metanotrofia com o fluxo de CH₄ e variáveis ambientais (SCAVINO et al., 2013; DOUTERELO et al., 2014; JI et al., 2015; SAWAKUCHI et al., 2016).

2.3.2 Sequenciamento em larga escala do gene 16S rRNA

Com o desenvolvimento das primeiras metodologias de sequenciamento de DNA e o sequenciamento do primeiro genoma completo de um microrganismo (SANGER et al., 1977), um novo momento se iniciou para a microbiologia. Após a publicação do genoma do PhiX147, Carl Woese, em uma revisão sobre evolução de bactérias, fez uma análise minuciosa sobre as características evolutivas dos genes ribossomais, evidenciando a importância desses genes serem utilizados como um marcador universal para bactérias (WOESE, 1987).

A identificação taxonômica é uma etapa importante para a análise de comunidades microbianas. A robustez desta técnica depende de uma série de processamentos iniciais, incluindo a filtragem dos dados brutos, identificação de quimeras e remoção de sequências não-biológicas (SCHLOSS et al., 2011). Um importante conceito utilizado nas análises de comunidades microbianas é o agrupamento das sequências em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs, do inglês *Operational Taxonomic Units*). Esse conceito foi utilizado pela primeira vez por Sokal (1963) na área de botânica, porém com o avanço dos métodos moleculares esse conceito também passou a ser utilizado por microbiologistas (MCCAIG et al., 1999).

Sequências múltiplas de DNA são agrupadas em diferentes OTUs a partir de um nível arbitrário de identidade de sequências (por exemplo, 97% de identidade representa um mesmo gênero, já 95% de identidade representa uma mesma família) (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005). A principal vantagem do agrupamento das sequências em OTUs é a redução da demanda computacional para as análises, uma vez que o número de sequências é reduzido a partir do momento que se escolhe uma sequência representativa de um conjunto de sequências em uma OTU.

Dentre as tecnologias de sequenciamento em larga escala do gene 16S rRNA, a plataforma Illumina Hiseq 2500 vem sendo largamente utilizada em estudos de ecologia microbiana. A partir da preparação de uma biblioteca do gene 16S rRNA, é realizado massivo

sequenciamento paralelo de milhares de fragmentos de DNA reunidos em *clusters* (grupos de sequências idênticas). O sequenciamento é realizado pelo método de terminação de cadeia reversível, ou seja, o nucleotídeo terminador não interrompe definitivamente a adição dos próximos dNTPs. Após a emissão e detecção da fluorescência correspondente à base incorporada à fita de DNA, o fluoróforo se desliga do dNTP marcado e os próximos dNTPs podem ser adicionados à mesma fita nos próximos ciclos de sequenciamento. Esse sequenciamento base a base proporciona alta acurácia à técnica, diminuindo significativamente a taxa de erro do processo (ILLUMINA, 2015).

Recentemente, Narrowe et al. (2017) constataram uma diversidade inexplorada de arqueias em sedimentos de áreas alagadas de Ohio (EUA) a partir do sequenciamento de alta-resolução do gene 16S rRNA, correlacionando esses dados com hipóteses sobre os processos que regem os ciclos biogeoquímico, em especial o ciclo do CH₄. Esse trabalho evidenciou ainda mais a importância do uso do sequenciamento do gene 16S rRNA para estudos em ecologia microbiana.

3. HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 Hipótese

O presente trabalho se baseou na hipótese de que o potencial de emissão e consumo de CH₄ em áreas alagáveis da Amazônia Oriental sofre influência das condições sazonais de seca e cheia; este potencial está relacionado com a microbiota presente nos sedimentos, em especial, as comunidades metanogênicas e metanotróficas.

3.2 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a dinâmica dos genes funcionais envolvidos no ciclo do CH₄ em épocas contrastantes, ou seja, sob condições de alagamento e seca, correlacionando com o fluxo do gás, variáveis ambientais e perfil taxonômico de *Bacteria* e *Archaea*, em sedimentos de áreas alagáveis e, como comparativo, solo de floresta primária, da Amazônia Oriental.

3.2.1 Objetivos específicos

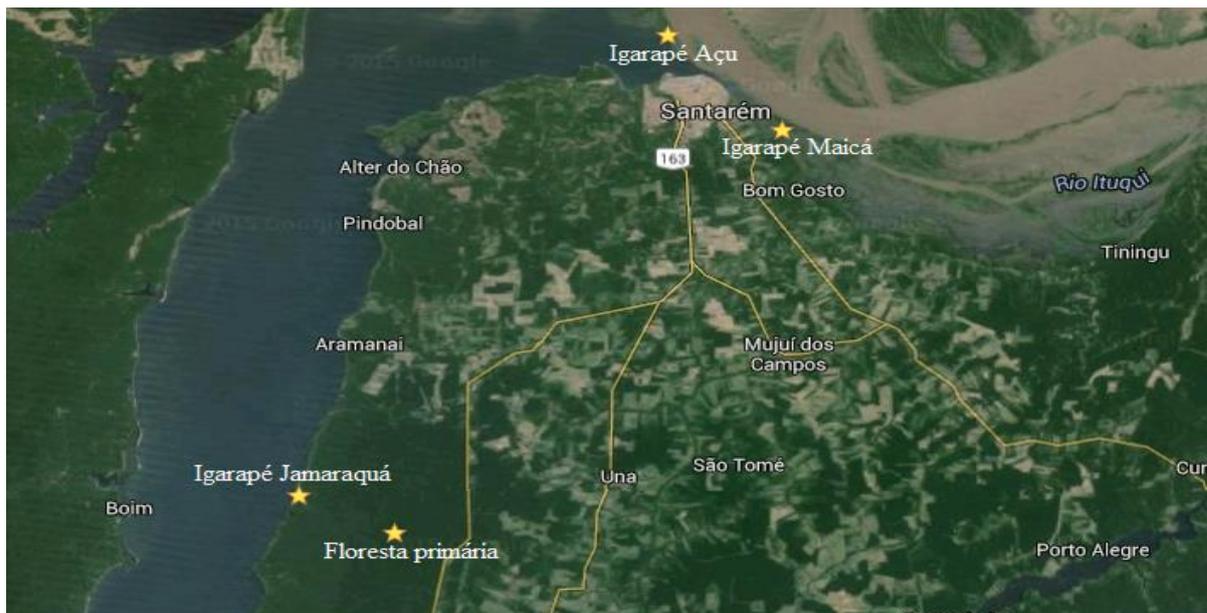
- Determinação da concentração de CH₄ retido no sedimento das áreas alagáveis estudadas, durante a época de cheia;
- Mensuração do fluxo de emissão de CH₄ nas áreas de estudo durante a época seca;
- Quantificação dos genes 16S rRNA de *Bacteria* e *Archaea* e dos genes funcionais *mcrA* e *pmoA* nas amostras de sedimentos e solo;
- Determinação de estimativas de riqueza e medidas de diversidade e do perfil taxonômico das comunidades de *Bacteria* e *Archaea* nas áreas de estudo a partir do sequenciamento em larga escala dos genes 16S rRNA.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Áreas de estudo

As áreas de estudo estão localizadas na região centro-oeste do Pará, nos municípios de Santarém e Belterra. O clima regional é classificado como Am (Köppen), tropical úmido com diferença de temperatura anual inferior a 5 °C e regime pluviométrico com estação seca, mas com precipitação total acima de 2.500 mm anuais (ALVARES et al., 2013), onde 70% da precipitação anual é concentrada no período de dezembro a junho. Foram selecionadas três áreas alagáveis, cada uma delas com diferentes características quanto à procedência da água que corre em seus leitos e quanto à vegetação que compõe as florestas do entorno e uma área de floresta primária (Figura 3).

Figura 3 - Localização das áreas de estudo

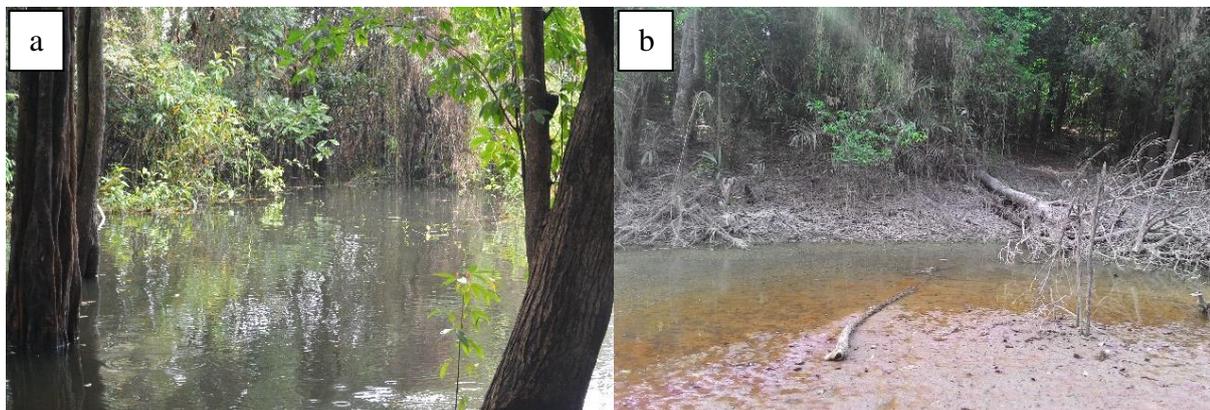


Fonte: Retirado do Google Maps.

O igarapé Jamaraquá (S2 49.077 W55 02.077), localizado na Floresta Nacional do Tapajós, é circundado em toda sua extensão por floresta primária (plantas C3 em sua maioria) (Figura 4). Quando encontra o rio Tapajós, as águas do igarapé Jamaraquá são represadas na foz deste curso d'água. Nesta área o leito do igarapé é apenas circundado pela floresta, mas não encoberto por ela como acontece nas nascentes, possibilitando a entrada de luz e consequente crescimento de uma diversidade de plantas aquáticas de ciclo C3, principalmente do gênero *Utricularia*, que cobrem todo o fundo do curso d'água. A vegetação presente na bacia de drenagem do igarapé Jamaraquá é exuberante e sem sinais de perturbação antrópica.

Dentre as áreas amostradas, o igarapé Jamaraquá é o que se mantém sob condições de alagamento por mais tempo durante o ano (MOURA, 2005).

Figura 4 - Igarapé Jamaraquá



Igarapé Jamaraquá em (a) maio/2016 e (b) outubro/2016.

O igarapé Maicá (S2 28.186 W54 38.831) é um afluente do rio Amazonas e é circundado por vegetação característica de várzea (Figura 5). Em seu leito correm águas brancas ricas em sedimento em suspensão e nutrientes dissolvidos devido ao intemperismo das rochas andinas (JUNK et al., 2011). Nesse igarapé ocorre durante a fase de cheia o crescimento de capim (planta C4) do gênero *Paspalum* sp, popularmente conhecido como “premembeca” (MOURA, 2005).

Figura 5 - Igarapé Maicá

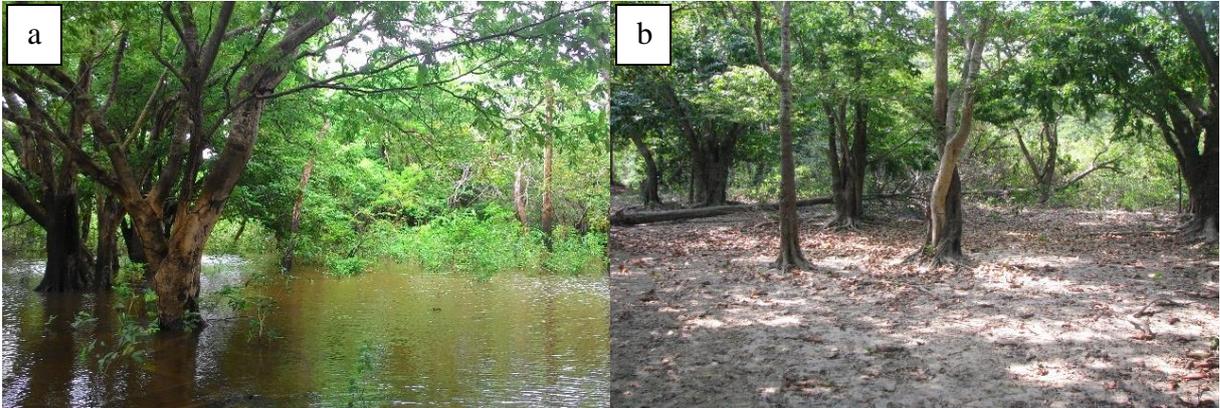


Igarapé Maicá em (a) maio/2016 e (b) outubro/2016.

O igarapé Açú (S2 22.747 W54 44.352), por ser um canal que liga o rio Tapajós ao rio Amazonas, sofre, no período de cheia, influência das águas de ambos os rios. Diferentemente das demais áreas alagáveis utilizadas nesse estudo, onde ocorre o crescimento de uma vegetação específica (plantas C4 no igarapé Maicá e plantas aquáticas C3 no igarapé

Jamaraquá), ocorre no igarapé Açú o crescimento de ambos os tipos de vegetação (MOURA, 2005) (Figura 6).

Figura 6 - Igarapé Açú

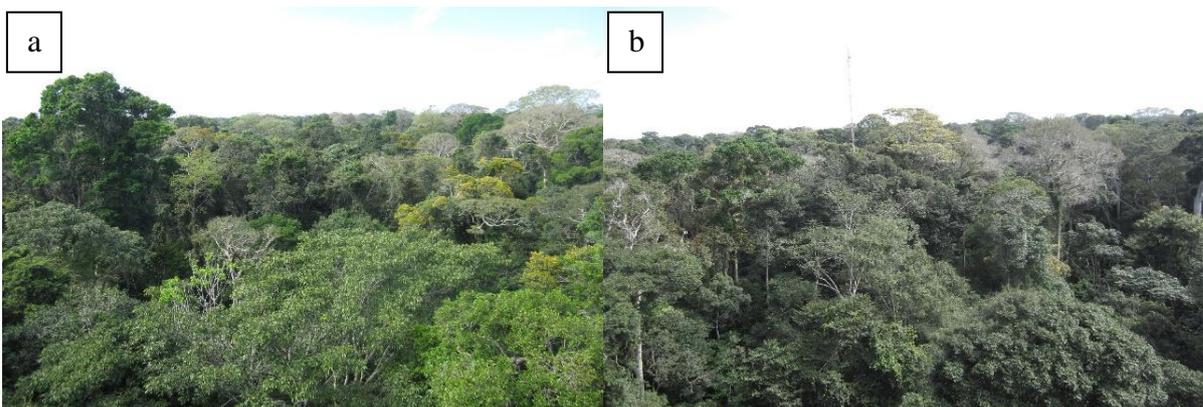


Igarapé Açú em (a) maio/2016 e (b) outubro/2016.

Tanto no igarapé Maicá como no Açú, os moradores locais promovem a pecuária de subsistência. Assim, o capim que cresce nesses igarapés é forrageado pelo gado solto nos arredores. É importante ressaltar que essas duas áreas não têm bacias de drenagem bem delimitadas e não apresentam nascentes definidas onde aflora água subterrânea. Em ambos os casos, a formação dos igarapés ocorre em função do preenchimento das depressões do terreno pelas águas dos rios Amazonas e Tapajós formando cursos d'água secundários (MOURA, 2005).

A área de floresta primária (S2 51.326 W54 57.501) escolhida para o presente estudo está localizada no quilômetro 67 da Floresta Nacional do Tapajós, importante unidade de conservação da natureza e cobertura florestal fortemente preservada, localizada às margens do Rio Tapajós, na Bacia Amazônica (Figura 7).

Figura 7 - Floresta primária

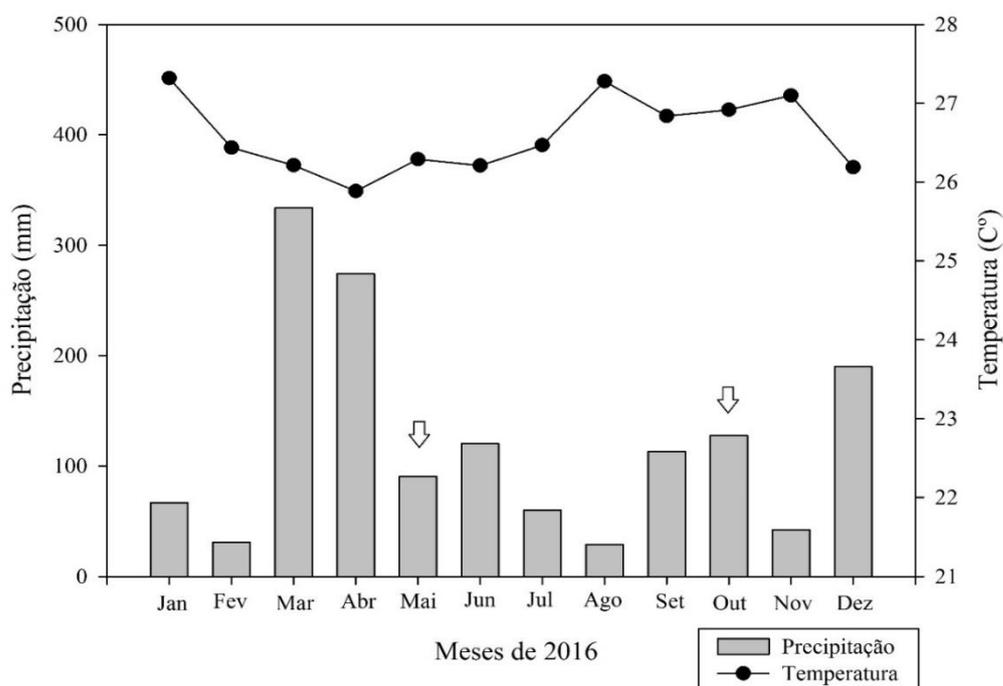


Visão de cima (45 metros de altura) da Floresta Primária em (a) maio/2016 e (b) outubro/2016.

4.2 Amostragens

Foram realizadas amostragens de sedimentos, solo e gases em duas épocas, maio e outubro de 2016, consideradas “seca de águas altas”, onde o rio alcança seu máximo caudal devido às chuvas registradas em meses anteriores e “seca de águas baixas”, onde as águas atingem seu nível mínimo, respectivamente, devido ao regime de chuvas e nível da água nas áreas alagáveis amostradas (Gráfico 1). Por convenção, ao longo do trabalho essas épocas contrastantes foram citadas como “cheia” e “seca”.

Gráfico 1 - Precipitação total acumulada e temperatura compensada média mensais durante o ano de 2016.



As setas indicam os meses em que foram realizadas as amostragens. Dados obtidos no site do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), referentes à Estação 82246 (Belterra, PA)

4.2.1 Coleta e processamento amostras de sedimentos e solo

Na área de floresta primária, a amostragem foi realizada num transecto de quatro pontos, onde a camada de serapilheira foi retirada e o solo coletado na camada entre 0 a 10 cm de profundidade. O solo de cada ponto foi homogeneizado, armazenado em um tubo do tipo Falcon de 50 mL e congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para melhor conservação do material visando à extração de DNA. O restante do solo foi armazenado em câmara fria a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, para análises físico-químicas. Imediatamente após a coleta do solo, foram registradas a temperatura e umidade do solo, além da umidade do ar.

Na época cheia, a coleta de sedimento nas áreas alagáveis foi realizada em quatro pontos por área, em profundidades entre 0,5 e 3 m, dependendo do nível da água. Para a determinação da temperatura, oxigênio dissolvido e pH na interface água sedimento foi utilizada a sonda YSI Professional Plus Instrument (Pro Plus). Tubos de PVC de 50x5 cm foram inseridos no sedimento até uma profundidade de 10 cm. Tanto as extremidades superior e inferior foram fechadas e os tubos mantidos na vertical. Em seguida, o sedimento de cada ponto foi retirado do tubo de PVC, homogeneizado, armazenado em tubo Falcon de 15 mL e imediatamente congelados a -20 °C, para melhor conservação do material visando a extração de DNA. O restante do sedimento foi armazenado em câmara fria a 4 °C, para análises físico-químicas.

Na época seca, a amostragem de sedimento nas áreas alagáveis foi realizada seguindo dos mesmos critérios da área de floresta.

4.2.1.1 Análise físico-química das amostras de sedimentos e solo

Cerca de 600 g de sedimento solo de cada ponto coletado nas áreas alagáveis e floresta primária foi enviada para o Laboratório de Análises Químicas do Departamento de Ciência do Solo da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP), para a análise das suas propriedades físico-químicas.

No laboratório, foi realizada a análise química para fins de avaliação da fertilidade do solo, que consistiu na determinação do pH em CaCl₂; fósforo, potássio, cálcio e magnésio, pela extração em resina trocadora de íons; alumínio pela extração de cloreto de cotássio 1 mol/L; acidez potencial acidez potencial estimada pelo pH SMP; matéria orgânica (g/Kg) pelo método de dicromato/titulométrico; boro pela extração com água quente; cobre, ferro, manganês e zinco extraídos pelo extrator DTPA-TEA (pH 7,3); e dos cálculos SB (soma de bases), CTC (capacidade de troca de cátions), V% (saturação por bases) e m% (saturação em alumínio). Na época seca, também foi realizada a análise física das amostras, que consiste na determinação do conteúdo de areia, por pesagem; silte e argila, pelo uso do densímetro.

4.2.1.2 Determinação da umidade das amostras de sedimentos e solo

A umidade das amostras de solo e sedimentos foi determinada em triplicata para cada amostra de solo imediatamente à coleta e transporte dos solos das áreas de estudo. Para cada ponto, cada placa de Petri foi pesada, adicionada de 5 g de solo, pesada novamente e colocada em estufa pré-aquecida a 105 °C. Cada placa foi pesada após 24, 48, 72 e 96 horas. Após o peso do solo de cada placa se estabilizar, a mesma foi novamente pesada. O teor de matéria

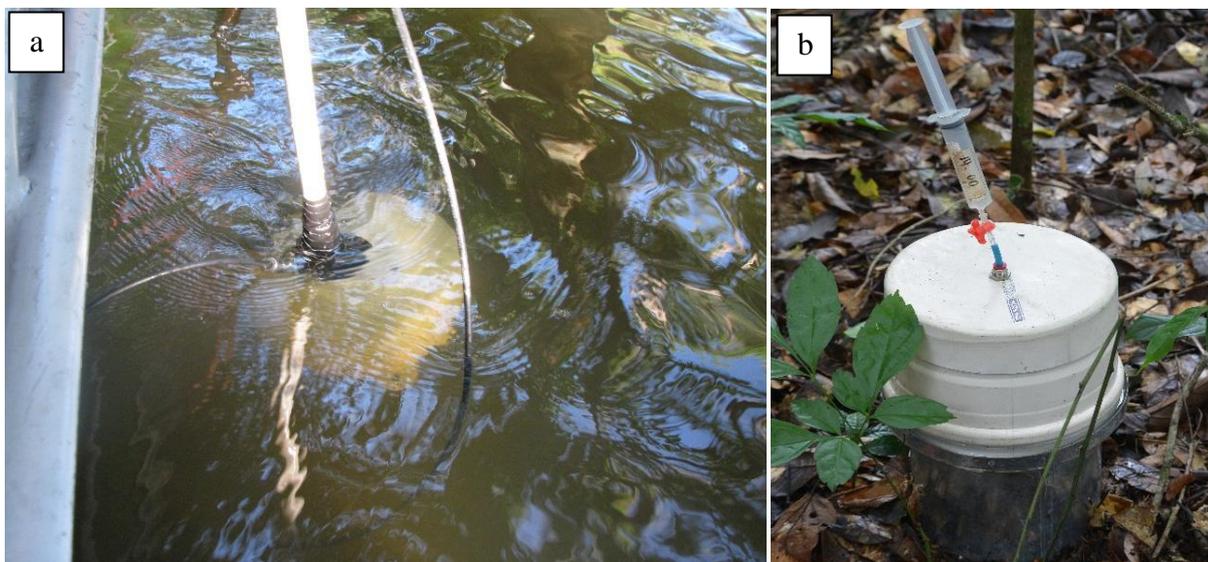
seca foi calculado pela fórmula: (Porcentagem de matéria seca) = (Massa de solo seco/Massa de solo úmido) x 100%. A partir do resultado, a umidade foi calculada pela fórmula: (Porcentagem de umidade) = 100 - (Porcentagem de matéria seca).

4.2.2 Coletas do gás metano (CH₄)

Na época cheia, após a amostragem de sedimento em cada ponto, a coleta do gás metano (CH₄) foi realizada a partir da agitação do sedimento, provocando o desprendimento dos gases na forma de bolhas, que foram coletadas em um funil plástico evitando qualquer contato com o ar atmosférico (Figura 8a). Aproximadamente 30 mL de gás foram retirados por meio de uma seringa conectada ao funil. As amostras foram injetadas em frascos de vidro e fechadas com tampas de borracha ainda no meio aquático, para evitar contaminação pelo ar atmosférico.

Já na época seca, em cada ponto de amostragem de sedimento e solo de floresta, foram instaladas câmaras compostas de base fixa e tampa para a coleta do gás metano (CH₄) (Figura 8b). A coleta do gás acumulado no interior das câmaras foi realizada anteriormente a coleta de solo por 30 minutos (0, 10, 20 e 30 minutos) após o fechamento das tampas.

Figura 8 - Métodos de amostragem de CH₄



Coleta do gás metano, (a) amostragem de bolhas de gás retidas nos sedimentos durante a época cheia e (b) coleta do gás metano para determinação do fluxo do gás durante a época seca.

Os conjuntos de amostras de gases foram analisadas quanto à concentração de CH₄ por cromatografia gasosa no cromatógrafo SRI 8610C (Torrance, CA, EUA). Os resultados dos fluxos do gás CH₄ durante a época seca foram calculados pela alteração da concentração do

gás no interior das câmaras de acordo com o tempo incubado, o que foi realizado pela análise das amostras dos diferentes tempos após o fechamento da tampa.

4.3 Extração de DNA de sedimentos e solo

O DNA total do solo e sedimentos foram extraídos em duplicata com o PowerLyzer PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBIO Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Contudo, algumas etapas foram alteradas para se obter maior quantidade e melhor qualidade das amostras de DNA extraídas. Para isso, foram adicionadas 0,25 g do solo ou sedimento de cada amostra em tubos de 2 mL (Glass Bead Tubes) com microesferas de vidro de 0,1 mm. Em cada tubo, foram adicionados 750 µL da solução Bead Solution. Os tubos foram agitados fracamente no vórtex. A seguir, foram acrescentados 60 µL da Solução C1 em cada tubo. Os tubos foram agitados rapidamente no vórtex, agitados na velocidade máxima por 15 minutos no Vortex-Genie 2 (MoBIO Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA) e centrifugados a $10.000 \times g$ por 3 minutos. O sobrenadante de cada tubo foi transferido para um tubo de 1,5 mL (Collection Tube), ao qual foram adicionados 250 µL da Solução C2. Os tubos foram agitados no vórtex por 5 segundos, incubados em mini cooler a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos e centrifugados a $10.000 \times g$ por 1 minuto. Foram transferidos 600 µL do sobrenadante de cada amostra para outro tubo e adicionados 200 µL da Solução C3. Os tubos foram agitados no vórtex, incubados em mini cooler a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos e centrifugados a $10.000 \times g$ por 1 minuto. Depois, foram transferidos 750 µL do sobrenadante de cada amostra para outro tubo e adicionados 1200 µL da Solução C4. Os tubos foram agitados no vórtex por 5 segundos. Foram transferidos 675 µL do sobrenadante de cada tubo para uma coluna com filtro (Spin Filter), inserida em outro tubo. Os tubos foram centrifugados a $10.000 \times g$ por 1 minuto e o líquido de cada tubo foi descartado. Mais 675 µL do sobrenadante de cada tubo foram transferidos para a mesma coluna utilizada anteriormente. Os tubos foram centrifugados a $10.000 \times g$ por 1 minuto e o líquido restante de cada tubo foi descartado. O procedimento foi repetido novamente até o término do sobrenadante de cada tubo. Após essa etapa, foram adicionados 500 µL da Solução C5 em cada tubo. Os tubos foram centrifugados a $10.000 \times g$ por 30 segundos e o sobrenadante foi descartado. Os tubos foram novamente centrifugados a $10.000 \times g$ por 1 minuto. Cada coluna foi transferida para um novo tubo, no qual foram adicionados 100 µL da Solução C6. Por fim, os tubos foram centrifugados a $10.000 \times g$ por 30 segundos.

A quantidade e qualidade das amostras de DNA foram analisadas em espectrofotômetro Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA)

com densidade ótica de 260 nm, assim como conferidas em gel de agarose 1%, corado com GelRed™ (Biotium, Fremont, CA, USA), em TSB (do inglês Sodium Borate Buffer) (BRODY; KERN, 2004). O gel foi submetido a um campo elétrico de 100 V por aproximadamente 30 minutos e posteriormente foto-documentado. O DNA total extraído das amostras foi armazenado em freezer a -20 °C.

4.4 PCR quantitativo em tempo real

A técnica de PCR quantitativo em tempo-real foi utilizada para quantificar as comunidades de *Archaea* e *Bacteria* e os genes associados ao ciclo do CH₄, *mcrA* e *pmoA* (Tabela 2) a partir das amostras de DNA total, na qual foi utilizada curva-padrão de amplificação como referência.

Tabela 2 - Sequências e referências dos *primers* dos genes *mcrA*, *pmoA*, 16S rRNA *Bacteria* e 16S rRNA *Archaea* utilizados neste estudo.

Gene	Primer	Sequência (5'-3')	Referência
<i>mcrA</i>	mcrA	GGTGGTGTMGGD TTCACMCARTA	Steimberg e Regan (2008)
	mcrA-rev	CGTTCATBGC GTAGTTVGGRTAGT	
<i>pmoA</i>	A189f	GGNGACTGGGACTTCTGG	Holmes et al. (1995)
	MB661r	CCGGMGCAACGTCYTAAAC	Costello e Lidstrom (1999)
16S <i>Bacteria</i>	926f	AACTCAAAGGAATTGACGG	Lane (1991)
	1062r	CTCACRRCACGAGCTGAC	Allen (2005)
16S <i>Archaea</i>	ARC787F	ATTAGATACCCSBGTAGTCC	Yu et al. (2005)
	ARC1059	GCCATGCACCWCCTCT	

4.4.1 Gene *mcrA*

A curva-padrão do gene foi feita a partir do DNA isolado de *Methanolinea mesophila* (DSMZ 23604), proveniente do depósito de culturas *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures* (DSMZ, do alemão *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*). A reação de amplificação foi preparada contendo 2,5 µL de 10X PCR Buffer (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA); 2,0 µL de MgCl₂ a 50 mM (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA); 0,25 µL de dNTP; 0,25 µL de BSA (do inglês *bovine serum albumin*) 1% (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA); 1 µL de cada primer a 5 pmol (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA); 0,15 µL de Platinum Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA); 1 µL de DNA do isolado e H₂O ultrapura para completar 25 µL. O programa utilizado no termociclador foi de 95 °C por 4 minutos; 40 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 45

segundos, 72 °C por 30 segundos; e 72 °C por 10 minutos. O produto de PCR foi conferido em gel de agarose 1%, corado com *GelRed*TM (Biotium, Fremont, CA, USA), em TSB (BRODY; KERN, 2004). O gel foi submetido a um campo elétrico de 100 V por aproximadamente 45 minutos e posteriormente foto-documentado.

O produto foi purificado com o uso do *GFX PCR DNA and Gel Band Kit* (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). Para isso, foram adicionados 100 µL da solução *Capture Buffer Type 3* para cada 20 µL de produto. Cada mistura foi homogeneizada e carregada em uma coluna GFX com filtro, presente dentro de um tubo de 2 mL (*Collection Tube*). Os tubos foram centrifugados a 16.000 × g por 30 segundos na centrífuga. Em cada tubo, foi descartado o filtrado resultante e adicionados 500 µL da solução *Wash Buffer Type 1*. Os tubos foram centrifugados duas vezes a 16.000 × g por 30 segundos. A coluna de cada amostra foi transferida para outro tubo de 1,5 mL, no qual foram adicionados 20 µL da solução *Elution Buffer Type 4*. Depois, os tubos foram incubados por 1 minuto na temperatura ambiente e centrifugados a 16.000 × g por 1 minuto. O produto foi quantificado em espectrofotômetro *Nanodrop 2000c* (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA) com densidade ótica adotada de 260 nm. A partir do produto, foi desenvolvida curva-padrão seriada com 10⁷ a 10¹ cópias do gene.

O gene foi quantificado em triplicata para cada amostra pela técnica de PCR quantitativo em tempo-real no StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). O qPCR foi realizado contendo 5 µl do *SYBR Green ROX qPCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA), 1 µl de cada primer a 5 pmoL (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA), 0,2 µl de BSA a 20 mg/mL, 1 ng de DNA e H₂O ultrapura para completar 10 µL. O programa utilizado no termociclador foi de 95 °C por 10 minutos; 45 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 45 segundos, 72 °C por 30 segundos. Ao final, foi incluída uma curva de melting com 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto e 95 °C por 15 segundos com leitura de dados a cada 0,5 °C.

4.4.2 Gene *pmoA*

A curva-padrão do gene foi feita a partir do DNA isolado de *Methylosinus sporium* (DSMZ 17706), proveniente do depósito de culturas *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures* (DSMZ, do alemão *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*). A reação de amplificação foi preparada contendo 2,5 µL de 10X PCR Buffer (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA); 1,5 µL de MgCl₂ a 50 mM (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA); 0,25 µL de dNTP; 0,25 µL de BSA 1%

(Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA); 1 μL de cada primer a 5 pmol (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA); 0,2 μL de Platinum Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA); 1 μL de DNA do isolado e H_2O ultrapura para completar 25 μL . O programa utilizado no termociclador foi de 95 °C por 4 minutos; 40 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 58 °C por 45 segundos, 72 °C por 45 segundos; e 72 °C por 10 minutos. O produto de PCR foi conferido em gel de agarose 1%, corado com *GelRed*TM (Biotium, Fremont, CA, USA), em TSB (BRODY; KERN, 2004). O gel foi submetido a um campo elétrico de 100 V por aproximadamente 45 minutos e posteriormente foto-documentado.

O produto foi purificado com o uso do *GFX PCR DNA and Gel Band Kit* (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). Para isso, foram adicionados 100 μL da solução *Capture Buffer Type 3* para cada 20 μL de produto. Cada mistura foi homogeneizada e carregada em uma coluna GFX com filtro, presente dentro de um tubo de 2 mL (*Collection Tube*). Os tubos foram centrifugados a $16.000 \times g$ por 30 segundos na centrífuga. Em cada tubo, foi descartado o filtrado resultante e adicionados 500 μL da solução *Wash Buffer Type 1*. Os tubos foram centrifugados duas vezes a $16.000 \times g$ por 30 segundos. A coluna de cada amostra foi transferida para outro tubo de 1,5 mL, no qual foram adicionados 20 μL da solução *Elution Buffer Type 4*. Depois, os tubos foram incubados por 1 minuto na temperatura ambiente e centrifugados a $16.000 \times g$ por 1 minuto. O produto foi quantificado em espectrofotômetro *Nanodrop 2000c* (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA) com densidade ótica adotada de 260 nm. A partir do produto, foi desenvolvida curva-padrão seriada com 10^7 a 10^1 cópias do gene.

O gene foi quantificado em triplicata para cada amostra pela técnica de PCR quantitativo em tempo-real no StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). O qPCR foi realizado contendo 5 μL do *SYBR Green ROX qPCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA), 1 μL de cada primer a 5 pmol (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA), 0,2 μL de BSA a 20 mg/mL, 1 ng de DNA e H_2O ultrapura para completar 10 μL . O programa utilizado no termociclador foi de 95 °C por 10 minutos; 45 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos, 72 °C por 45 segundos. Ao final, foi incluída uma curva de melting com 95 °C por 15 segundos, 58 °C por 1 minuto e 95 °C por 15 segundos com leitura de dados a cada 0,5 °C.

4.4.3 Gene 16S rRNA *Bacteria*

A curva-padrão do gene foi feita a partir do DNA isolado de *Gordonia sp.* (DSMZ 11192), proveniente do depósito de culturas *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures* (DSMZ, do alemão *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*). A reação de amplificação foi preparada contendo 3,5 µL de 10X PCR Buffer (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA); 1,05 µL de MgCl₂ a 50 mM (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA); 0,35 µL de dNTP; 1,4 µL de cada primer a 5 pmol (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA); 0,3 µL de Platinum Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA); 1 µL de DNA do isolado e H₂O ultrapura para completar 35 µL. O programa utilizado no termociclador foi de 95 °C por 15 minutos; 40 ciclos de 95 °C por 45 segundos, 59 °C por 15 segundos, 72 °C por 20 segundos; e 72 °C por 5 minutos. O produto de PCR foi conferido em gel de agarose 1%, corado com *GelRed*TM (Biotium, Fremont, CA, USA), em TSB (BRODY; KERN, 2004). O gel foi submetido a um campo elétrico de 100 V por aproximadamente 45 minutos e posteriormente foto-documentado.

O produto foi purificado com o uso do *GFX PCR DNA and Gel Band Kit* (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). Para isso, foram adicionados 100 µL da solução *Capture Buffer Type 3* para cada 20 µL de produto. Cada mistura foi homogeneizada e carregada em uma coluna GFX com filtro, presente dentro de um tubo de 2 mL (*Collection Tube*). Os tubos foram centrifugados a 16.000 × g por 30 segundos na centrífuga. Em cada tubo, foi descartado o filtrado resultante e adicionados 500 µL da solução *Wash Buffer Type 1*. Os tubos foram centrifugados duas vezes a 16.000 × g por 30 segundos. A coluna de cada amostra foi transferida para outro tubo de 1,5 mL, no qual foram adicionados 20 µL da solução *Elution Buffer Type 4*. Depois, os tubos foram incubados por 1 minuto na temperatura ambiente e centrifugados a 16.000 × g por 1 minuto. O produto foi quantificado em espectrofotômetro *Nanodrop 2000c* (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA) com densidade ótica adotada de 260 nm. A partir do produto, foi desenvolvida curva-padrão seriada com 10⁹ a 10⁵ cópias do gene.

O gene foi quantificado em triplicata para cada amostra pela técnica de PCR quantitativo em tempo-real no StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). O qPCR foi realizado contendo 5 µl do *SYBR Green ROX qPCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA), 1 µl de cada primer a 5 pmol (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA), 0,2 µl de BSA a 20 mg/mL, 1 ng de DNA e H₂O ultrapura para completar 10 µL. O programa utilizado no termociclador

foi de 95 °C por 15 minutos; 40 ciclos de 95 °C por 45 segundos, 60 °C por 15 segundos, 72 °C por 20 segundos. Ao final, foi incluída uma curva de melting com 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto e 95 °C por 15 segundos com leitura de dados a cada 0,7 °C.

4.4.4 Gene 16S rRNA *Archaea*

A curva-padrão do gene foi feita a partir do DNA isolado de *Methanolinea mesophila* (DSMZ 23604), proveniente do depósito de culturas *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures* (DSMZ, do alemão *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*). A reação de amplificação foi preparada contendo 3,5 µL de 10X PCR Buffer (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA); 1,05 µL de MgCl₂ a 50 mM (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA); 0,45 µL de dNTP; 0,60 µL de BSA 1% (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA); 1,40 µL de cada primer a 5 pmol (Thermo Scientific); 0,30 µL de Platinum Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA); 1 fµL de DNA do isolado e H₂O ultrapura para completar 35 µL. O programa utilizado no termociclador foi de 95 °C por 10 minutos; 45 ciclos de 95 °C por 45 segundos, 57 °C por 45 segundos, 72 °C por 45 segundos; e 72 °C por 10 minutos. O produto de PCR foi conferido em gel de agarose 1%, corado com *GelRed*TM (Biotium, Fremont, CA, USA), em TSB (BRODY; KERN, 2004). O gel foi submetido a um campo elétrico de 100 V por aproximadamente 45 minutos e posteriormente foto-documentado.

O produto foi purificado com o uso do *GFX PCR DNA and Gel Band Kit* (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). Para isso, foram adicionados 100 µL da solução *Capture Buffer Type 3* para cada 20 µL de produto. Cada mistura foi homogeneizada e carregada em uma coluna GFX com filtro, presente dentro de um tubo de 2 mL (*Collection Tube*). Os tubos foram centrifugados a 16.000 × g por 30 segundos na centrífuga. Em cada tubo, foi descartado o filtrado resultante e adicionados 500 µL da solução *Wash Buffer Type 1*. Os tubos foram centrifugados duas vezes a 16.000 × g por 30 segundos. A coluna de cada amostra foi transferida para outro tubo de 1,5 mL, no qual foram adicionados 20 µL da solução *Elution Buffer Type 4*. Depois, os tubos foram incubados por 1 minuto na temperatura ambiente e centrifugados a 16.000 × g por 1 minuto. O produto foi quantificado em espectrofotômetro *Nanodrop 2000c* (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA) com densidade ótica adotada de 260 nm. A partir do produto, foi desenvolvida curva-padrão seriada com 10⁷ a 10¹ cópias do gene.

O gene foi quantificado em triplicata para cada amostra pela técnica de PCR quantitativo em tempo-real no StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems,

Foster, CA, USA). O qPCR foi realizado contendo 5 µl do *SYBR Green ROX qPCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA), 1 µl de cada primer a 5 pmol (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA), 0,2 µl de BSA a 20 mg/mL, 1 ng de DNA e H₂O ultrapura para completar 10 µL. O programa utilizado no termociclador foi de 95 °C por 10 minutos; 45 ciclos de 95 °C por 45 segundos, 57 °C por 45 segundos, 72 °C por 45 segundos. Ao final, foi incluída uma curva de melting com 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto e 95 °C por 15 segundos com leitura de dados a cada 0,5 °C.

4.5 Sequenciamento em larga escala dos genes 16S rRNA de *Bacteria* e *Archaea*

O sequenciamento em larga escala foi realizado na Novogene Bioinformatics Technology (Beijing, China), a partir de amostras de DNA de três pontos por área das duas épocas de amostragem. As amplificações por PCR foram realizadas com o conjunto de primers 515f/806r (CAPORASO et al., 2011) e 519f/915r (KLINDWORTH et al., 2012; STAHL; AMMAN, 1991), que amplificam a região V4 do gene 16S rRNA de *Bacteria* e *Archaea*, respectivamente, e o sequenciamento foi realizado na plataforma Illumina HiSeq 2500, no modo paired-end 250pb.

4.6 Análises dos dados

Os dados físico-químicos obtidos entre as diferentes áreas e diferentes épocas de amostragem foram testados quanto a sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e sua homogeneidade de variâncias no software SigmaPlot (San Jose, CA, USA). Uma vez que os dados seguiram os pressupostos dos testes não-paramétricos, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância na ferramenta estatística ActionStat (São Carlos, SP, BR).

Os dados relativos à concentração de CH₄ nas bolhas de gás retidas nos sedimentos e fluxo de CH₄ em câmaras de gás foram testados quanto a sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e sua homogeneidade de variâncias no software SigmaPlot (San Jose, CA, USA). Uma vez que os dados seguiram os pressupostos dos testes não-paramétricos, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância na ferramenta estatística ActionStat (São Carlos, SP, BR).

Os dados de oxigênio dissolvido e temperatura do sedimento relativos à amostragem da época cheia e temperatura ambiente, temperatura do sedimento/solo e umidade do sedimento/solo relativos a amostragem da época seca foram testados quanto a sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e sua homogeneidade de variâncias no software SigmaPlot (San Jose, CA, USA). Uma vez que os dados seguiram os pressupostos dos testes

paramétricos, foi realizado o teste de Tukey a 5% de significância na ferramenta estatística ActionStat (São Carlos, SP, BR).

Os dados obtidos por meio da técnica de qPCR foram analisados no programa StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) quanto a sua especificidade e eficiência. Os dados de abundância de cada amostra foram transformados em número de cópias por nanograma de DNA. Os dados foram testados quanto a sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e sua homogeneidade de variâncias no software SigmaPlot (San Jose, CA, USA). Uma vez que os dados seguiram os pressupostos dos testes não-paramétricos, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância na ferramenta estatística ActionStat (São Carlos, SP, BR). As correlações entre os dados foram realizadas a partir do teste de Spearman, no software SigmaPlot (San Jose, CA, USA).

O processamento computacional dos dados de sequenciamento de amplicon foi realizado a partir do protocolo de bioinformática disponível na plataforma BMPOS (PYLRO et al., 2016). As sequências *forward* e *reverse* foram unidas utilizando o software FLASH (<http://ccb.jhu.edu/software/FLASH>). As sequências de baixa qualidade foram removidas a partir de um critério de phred score menor que 20 e tamanho menor que 200 bp. Na identificação e quantificação de OTUs foi utilizando o software UPARSE (EDGAR, 2013). A identificação taxonômica foi realizada no software RDP-classifier (WANG et al., 2007), utilizando o banco de dados SILVA (versão 128). A diversidade e riqueza de UTOs foi realizada a partir do pacote *vegan*, disponível na plataforma R (IXON, 2003)

A visualização para análise exploratória de dados foi realizada nos softwares SigmaPlot, STAMP e ggplot2.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Propriedades físico-químicas dos sedimentos e solo

Os resultados das análises estatísticas revelaram uma série de diferenças entre os sedimentos e solo de floresta do presente estudo, indicando diferentes padrões químicos durante os dois períodos amostrados, como pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros químicos dos sedimentos e solo nas duas épocas de amostragem.

Parâmetro	Unidade	Jamaraquá	Maicá	Açu	Floresta
		Cheia	Cheia	Cheia	Cheia
pH	-	6,78 ± 0,15 aA	6,40 ± 0,15 bA	6,23 ± 0,13 cA	3,55 ± 0,06 dA
MO	g.dm ⁻³	25,50 ± 18,77 abA	15,25 ± 6,85 bcA	8,25 ± 2,06 cA	44,25 ± 0,50 aA
N	mg.kg. ⁻¹	1134,00 ± 1002,62 bA	1510,25 ± 155,83 bA	1389,50 ± 235,97 bA	3200,75 ± 345,65 aA
P	mg.dm ⁻³	4,50 ± 1,91 bA	12,25 ± 2,22 aA	12,75 ± 5,06 aA	6,50 ± 0,58 bB
S	mg.dm ⁻³	19,00 ± 22,55 aA	16,50 ± 14,64 aA	13,25 ± 10,05 aA	6,50 ± 1,29 aB
K	mmolc.dm ⁻³	0,20 ± 0,14 dA	1,15 ± 0,69 bA	2,05 ± 0,17 aA	0,53 ± 0,10 cB
Ca	mmolc.dm ⁻³	3,00 ± 0,00 bA	5,00 ± 0,00 aA	5,75 ± 1,26 aA	3,50 ± 0,58 bA
Mg	mmolc.dm ⁻³	1,00 ± 0,00 cA	3,00 ± 0,00 bA	5,00 ± 1,41 aA	2,75 ± 0,96 bA
Al	mmolc.dm ⁻³	10,25 ± 10,40 cA	31,50 ± 10,41 aA	15,50 ± 1,73 bcA	21,25 ± 1,71 abA
H+Al	mmolc.dm ⁻³	48,75 ± 35,72 cA	112,75 ± 15,71 bA	72,50 ± 17,00 cA	138,50 ± 13,40 aA
SB	mmolc.dm ⁻³	1,68 ± 1,15 dA	9,15 ± 0,69 bB	12,80 ± 2,51 aA	6,53 ± 1,88 cA
CTC	mmolc.dm ⁻³	50,43 ± 36,80 cA	121,90 ± 15,16 bA	85,30 ± 19,18 cA	145,03 ± 13,46 dA
V	%	3,50 ± 1,29 cB	7,50 ± 1,29 bB	15,00 ± 1,83 aA	4,50 ± 1,29 cA
m	%	80,50 ± 10,28 aA	76,25 ± 6,99 aA	55,00 ± 3,37 bA	76,75 ± 5,25 aA
B	mg.dm ⁻³	0,30 ± 0,04 cA	0,46 ± 0,14 bA	0,23 ± 0,01 dA	0,69 ± 0,04 aA
Cu	mg.dm ⁻³	0,23 ± 0,05 cA	3,63 ± 0,28 aA	3,60 ± 1,13 aA	0,40 ± 0,14 bA
Fe	mg.dm ⁻³	96,50 ± 48,73 cA	150,50 ± 22,10 abA	119,50 ± 7,77 bcA	177,50 ± 55,29 aA
Mn	mg.dm ⁻³	0,60 ± 0,29 cA	69,38 ± 10,27 aA	95,28 ± 64,77 aA	3,95 ± 0,79 bA
Zn	mg.dm ⁻³	0,23 ± 0,10 cA	5,40 ± 0,73 aA	2,95 ± 0,99 bA	0,30 ± 0,08 cA
Parâmetro	Unidade	Seca	Seca	Seca	Seca
pH	-	4,40 ± 0,22 aB	3,80 ± 0,00 bB	3,70 ± 0,08 cB	3,25 ± 0,17 dB
MO	g.dm ⁻³	5,00 ± 2,00 cB	10,75 ± 3,20 bA	16,50 ± 19,74 bA	37,75 ± 12,95 aA
N	mg.kg. ⁻¹	295,75 ± 70,32 cB	1405,25 ± 54,03 bA	1617,00 ± 1162,80 bA	2626,75 ± 724,91 aA
P	mg.dm ⁻³	2,75 ± 1,26 cA	14,00 ± 2,16 aA	13,25 ± 3,59 aA	8,50 ± 1,29 bA
S	mg.dm ⁻³	12,50 ± 7,33 aA	10,50 ± 2,38 aA	15,50 ± 7,51 aA	17,75 ± 4,57 aA
K	mmolc.dm ⁻³	0,13 ± 0,05 cA	1,75 ± 0,31 aA	1,75 ± 0,70 aA	0,85 ± 0,06 bA
Ca	mmolc.dm ⁻³	4,25 ± 1,89 cA	10,50 ± 1,91 aB	6,50 ± 2,65 aA	3,25 ± 0,50 bA
Mg	mmolc.dm ⁻³	1,00 ± 0,00 bA	3,50 ± 0,58 aA	6,00 ± 2,16 aA	1,50 ± 0,58 bA
Al	mmolc.dm ⁻³	2,75 ± 1,26 cA	27,50 ± 1,91 aA	24,25 ± 15,15 abA	14,25 ± 3,50 bB
H+Al	mmolc.dm ⁻³	15,00 ± 2,45 bB	77,50 ± 22,78 aA	91,25 ± 43,77 aA	105,75 ± 41,68 aA
SB	mmolc.dm ⁻³	4,38 ± 2,68 bA	15,75 ± 2,20 aA	14,25 ± 5,15 aA	5,10 ± 1,76 bA
CTC	mmolc.dm ⁻³	19,38 ± 3,89 bA	93,25 ± 24,19 aA	105,50 ± 38,81 aA	110,85 ± 40,12 aA
V	%	21,50 ± 9,43 aA	17,75 ± 3,40 aA	16,25 ± 10,44 abA	5,50 ± 2,65 bA
m	%	42,00 ± 21,95 cB	63,75 ± 3,20 bB	60,25 ± 16,50 bA	73,50 ± 9,04 aA

B	mg.dm ⁻³	0,20 ± 0,00 bB	0,23 ± 0,05 bB	0,30 ± 0,22 bA	0,55 ± 0,21 aA
Cu	mg.dm ⁻³	0,10 ± 0,00 dB	3,15 ± 0,17 aB	2,25 ± 1,11 bA	0,28 ± 0,05 cA
Fe	mg.dm ⁻³	124,75 ± 61,55 bA	254,00 ± 78,51 aA	105,00 ± 49,55 bA	178,75 ± 54,24 abA
Mn	mg.dm ⁻³	0,30 ± 0,00 cB	29,03 ± 5,28 aB	81,98 ± 53,87 aA	1,98 ± 0,72 bB
Zn	mg.dm ⁻³	0,10 ± 0,00 bB	4,53 ± 0,84 aA	2,60 ± 1,96 aA	0,15 ± 0,06 bB

Em cada linha, os resultados apresentados correspondem às médias e aos desvios dos parâmetros analisados para cada área de estudo. Letras minúsculas representam a comparação entre as áreas no mesmo período de amostragem e letras maiúsculas representam a comparação dos períodos de amostragem em cada área. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste Kruskal Wallis, a 5% de probabilidade.

A caracterização química das áreas alagáveis foi de acordo com o que se encontra na literatura. As áreas alagáveis do rio Tapajós são caracterizadas por apresentar fertilidade baixa a intermediária e, em contrapartida, as áreas alagáveis do rio Amazonas são consideradas férteis (JUNK et al., 2011). O igarapé Jamaraquá apresentou baixos teores de nutrientes, já tendo sido relatado como quimicamente pobre por Silver et al. (2000). Os igarapés Maicá e Açú apresentaram maiores teores de nutrientes quando comparados ao Igarapé Jamaraquá na maioria dos padrões avaliados, inclusive nos teores potássio, cálcio, magnésio, cobre, ferro, manganês e zinco, devido à influência das águas do rio Amazonas que possuem concentrações relativamente altas de sólidos dissolvidos (JUNK et al., 2011). O rio Amazonas tem papel fundamental na alteração das características do rio Tapajós na sua foz, localizada próxima ao Igarapé Açú, e funciona como agente depurador tendo em vista o grande volume de suas águas neste trecho do rio (MIRANDA et al., 2009). Portanto, a semelhança nos padrões físico-químicos dos igarapés Maicá e Açú pode ser explicada pela proximidade entre eles.

Os sedimentos e solo utilizados nesse estudo também apresentaram diferentes padrões físicos. Em relação à classe textural das amostras, o sedimento relativo ao igarapé Jamaraquá apresentou classe de textura arenosa e aos igarapés Maicá e Açú apresentaram médio-arenosa. Os elevados teores de areia nos sedimentos referem-se ao intemperismo de rochas da região amazônica e consequente transporte e sedimentação de altas quantidades de quartzo nas áreas alagáveis (MIRANDA et al., 2009).

Em contrapartida, o solo de floresta primária utilizada nesse estudo apresentou classe textural muito argilosa. No geral, os solos de terra firme da região Amazônica sob floresta primária, são pobres em nutrientes, profundos, bem drenados com boa capacidade de retenção de água e permeabilidade, alto teor de argila, e baixa CTC (FERREIRA et al., 2006). A capacidade da Floresta Amazônica em desenvolver-se sobre solos ácidos, intemperizados e com baixa disponibilidade de nutrientes, produzindo grande quantidade de biomassa e alta

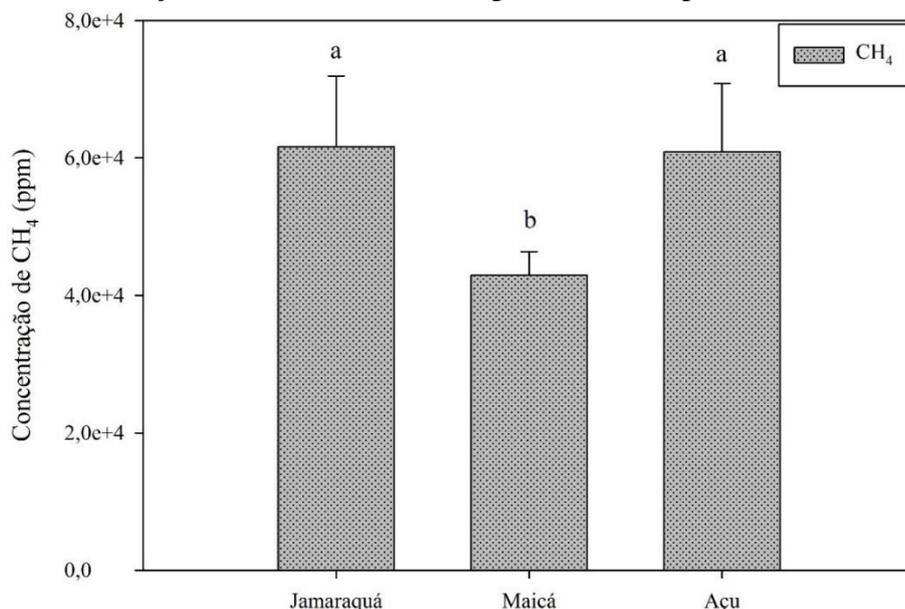
diversidade de espécies, deve-se à eficiente deposição e rápida liberação dos elementos minerais mediante a decomposição da serapilheira (NEVES et al., 2001).

Diferenças entre os sedimentos e o solo de floresta já eram esperados, já que essas áreas se mantêm em condições divergentes ao longo de boa parte do ano. Além disso, em relação às áreas alagáveis, também eram esperadas diferenças tanto entre as áreas, especialmente entre o Igarapé Jamaraquá e os Igarapés Maicá e Açú, devido as diferentes influências dos rios em que são banhadas, quanto entre as épocas, uma vez que a presença ou não de coluna d'água tem influência direta em vários padrões químicos, em especial o pH, onde se verifica aumentos em solos ácidos e diminuição em solos alcalinos durante o período de cheia, atingindo valores estáveis entre 6,0 e 7,0, três semanas após o início do alagamento, conforme observado por Soares (2005) e essa diferença também foi constatada nas áreas de estudo.

5.2 Coletas de gás metano (CH₄)

As coletas de gás CH₄ foram realizadas de duas formas, dependendo da condição de alagamento das áreas. Na época cheia, foi realizada a coleta de bolhas de gás com o objetivo de se determinar a concentração de metano retida no sedimento, como pode ser observado no Gráfico 2. Esse tipo de amostragem foi realizado somente nos igarapés, uma vez que a formação de bolhas de CH₄ só ocorre sob condições de alagamento devido à baixa solubilidade do gás em água.

Gráfico 2 - Concentração de CH₄ nas bolhas de gás durante a época seca.



As barras de erro representam o erro padrão da média. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste Kruskal Wallis, a 5% de probabilidade.

Durante a época cheia, também foi realizada a medição das variáveis oxigênio dissolvido e temperatura na interface água-sedimento, apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Oxigênio dissolvido e temperatura na interface água-sedimento durante a época cheia.

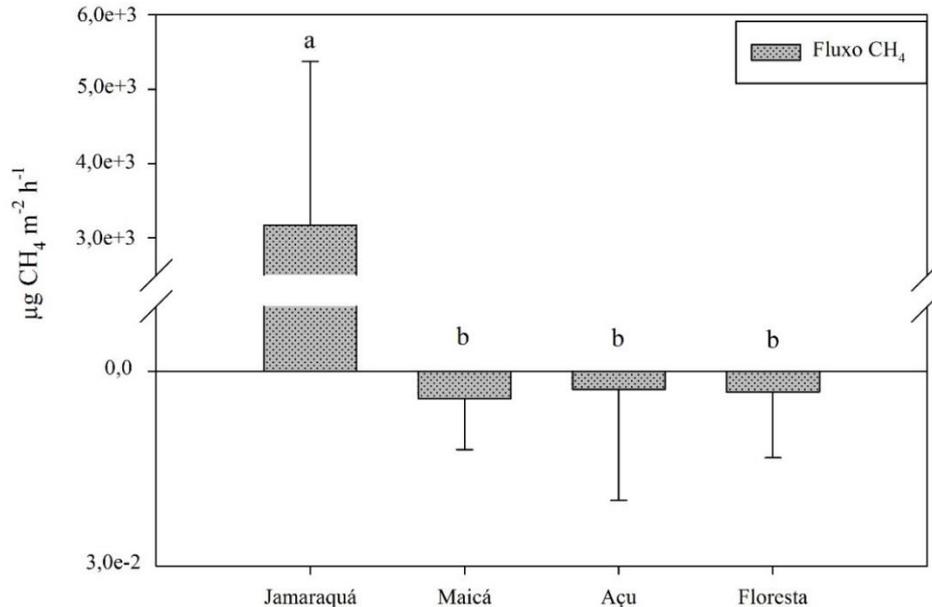
Parâmetro	Unidade	Jamaraquá	Maicá	Açu
OD	mgL. ⁻¹	3,01 ± 0,74 b	4,34 ± 0,74 a	3,55 ± 0,16 ab
Temperatura	°C	28,68 ± 1,00 b	30,05 ± 0,1 a	28,45 ± 0,21 b

Oxigênio dissolvido (OD) e temperatura na interface água-sedimento durante a época cheia seguidas pelo desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

Oxigênio dissolvido e temperatura são os fatores ambientais importantes que influenciam a dinâmica entre microrganismos metanogênicos e metanotróficos, consequentemente interferindo na produção e oxidação de CH₄. O aumento do oxigênio dissolvido no meio favorece a comunidade metanotrófica, resultando no consumo de metano disponível no meio (MAYLAN et al., 2016). O oxigênio dissolvido apresentou correlação -0,776 (p<0,05) com a concentração de CH₄, indicando que quanto maior o teor de oxigênio dissolvido no sedimento, menor a concentração de CH₄ nas bolhas de gás, inferindo-se uma maior atividade metanotrófica.

A temperatura ótima de produção de CH₄ varia entre 25 e 40 °C dependendo do clima e do solo (CHEN et al., 2015), e a temperatura ótima de oxidação varia entre 25 e 35 °C (MONHANTY et al., 2007). Apesar da temperatura ter apresentado correlação -0,676 (p<0,05) com a concentração de CH₄, nas áreas amostradas, os sedimentos se encontravam na faixa de temperatura ideal para os dois processos, metanogênese e metanotrofia, inferindo-se que o principal fator limitante para a oxidação de CH₄ nessas áreas está relacionado com o oxigênio dissolvido durante o período de cheia em que foi realizada a amostragem. Outros parâmetros, tais como pH, matéria orgânica, nitrogênio total, fósforo e enxofre não apresentaram correlações significativas em relação à concentração de CH₄ retido no sedimento durante a época cheia.

Já na época seca, a coleta de gás foi feita com o objetivo de se estimar o fluxo de CH₄ no momento da amostragem, onde também foi considerada a área de floresta primária (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Fluxo de CH₄ em câmara durante a época seca.

As barras de erro representam o erro padrão da média. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste Kruskal Wallis, a 5% de probabilidade.

Durante a coleta de CH₄, também foram realizadas as medições da temperatura do ar e temperatura dos sedimentos e solo de floresta. A determinação da umidade dos sedimentos e solo de floresta foi realizada em laboratório. Os dados obtidos estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - Temperatura ambiente, temperatura do sedimento/solo e umidade do sedimento/solo durante a época seca.

Parâmetro	Unidade	Jamaraquá	Maicá	Açú	Floresta
TA	°C	34,40 ± 0,8 a	33,83 ± 0,51 a	27,70 ± 0,14 b	25,00 ± 0,12 c
TS	°C	32,10 ± 1,68 a	31,73 ± 0,15 a	28,75 ± 0,26 b	25,43 ± 0,31 c
US	%	31,18 ± 12,86 a	35,48 ± 5,45 a	32,30 ± 2,35 a	27,43 ± 2,19 a

Temperatura ambiente (TA), temperatura do sedimento/solo (TS) e umidade do sedimento/solo (US) durante a época seca seguidas pelo desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

Nas áreas de estudo, o fluxo de CH₄ variou bastante entre os pontos de cada área, o que é evidenciado pelas barras de erro do gráfico, porém, no geral, os igarapés Maicá e Açú apresentam fluxos semelhantes à área de floresta no período de seca, apresentando-se como drenos de CH₄. Já o igarapé Jamaraquá apresentou fluxo positivo elevado de CH₄. Apesar de os pontos de coleta não estarem sob inundação no dia da amostragem e a umidade do sedimento ser semelhante às demais áreas, foi possível notar em campo que os pontos de

coleta no igarapé Jamaraquá foram naturalmente drenados pouco tempo antes da amostragem. Vários trabalhos realizados em campos de arroz indicam que a drenagem dos solos é capaz de suprimir a emissão de CH₄ (MA; LU, 2011; HAQUE et al., 2016). O fato desse igarapé se manter sob condições de alagamento a maior parte do ano, indica que nele possa existir uma comunidade metanogênica muito mais ativa, responsável pelo alto fluxo de CH₄ nessa área.

Durante a época seca, o igarapé Jamaraquá foi o que apresentou os maiores valores de pH e temperatura do solo. O fluxo de metano na época seca apresentou correlação 0,517 ($p < 0,05$) com pH e correlação 0,441 ($p < 0,05$) com a temperatura do solo. Esses valores de correlação indicam que pH e temperatura possuem um papel importante no fluxo de metano durante a época seca. Há relatos na literatura que a metanogênese é praticamente inibida em pH abaixo de 5,8 (MAYLAN et al., 2016), porém outros estudos mostram que o potencial de emissão de metano pode ser aumentado em até 30% com a redução do pH até 4,5 (TACONI et al., 2007).

Estudos relatam que sedimentos arenosos possuem maior potencial de emissão de metano, devido a não-retenção do gás nos poros de entre as partículas de areia (WANG et al., 1993; MAYLAN et al., 2016). Portanto, a textura arenosa do sedimento do Igarapé Jamaraquá também pode estar relacionada a alta taxa de emissão de metano obtida no dia da amostragem.

Assim como na época cheia, nas áreas estudadas, o fluxo de metano nas áreas no dia da amostragem não apresentou correlação significativa direta com matéria orgânica, nitrogênio total, fósforo e enxofre, indicando que o ciclo do metano nessas áreas é muito dinâmico, dependendo de vários fatores em conjunto.

Vale ressaltar que ambas as coletas de CH₄, tanto para determinação da concentração nas bolhas retidas no sedimento quando para o cálculo do fluxo diário retratam a realidade de um momento isolado, ou seja, do dia e hora em que foram amostradas. Esses dados podem ser utilizados como um indicativo, mas não conclusivos. Para tal, se faz necessária a análise comparativa com os dados moleculares.

5.3 DNA genômico dos sedimentos e solo

O DNA total dos sedimentos e solo foram extraídos em duplicata para cada amostra coletada nas quatro áreas de estudo, nas épocas de cheia e seca. Devido às otimizações do protocolo original, todas as amostras apresentaram resultados de 1,7 a 2,1 no parâmetro 260/280, consideradas com boa qualidade, medidos no Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA). As amostras de sedimento apresentaram de 2,0 a 35,8

ng/ μ L de DNA. Já as amostras de solo de floresta apresentaram de 31,8 a 71,8 ng/ μ L de DNA.

5.4 PCR quantitativo em tempo real

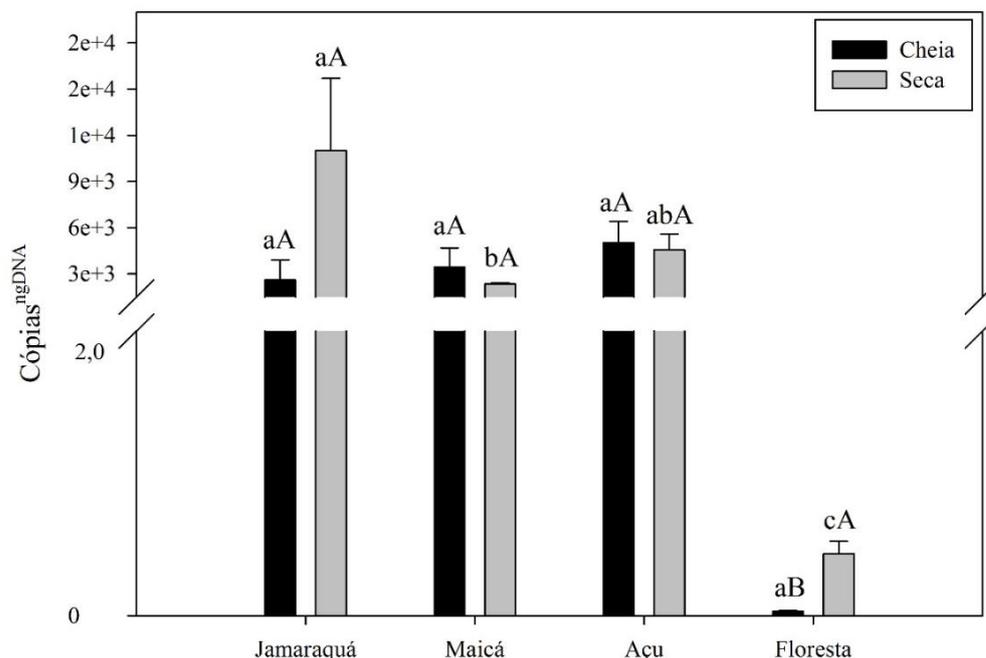
O PCR quantitativo em tempo real foi utilizado para comparar a abundância dos genes funcionais do ciclo do metano entre as diferentes áreas de estudo. A metodologia foi realizada com o uso de uma curva padrão para cada gene, composta por quantidades conhecidas dos genes, *mcrA*, *pmoA*, 16S rRNA *Bacteria* e 16S rRNA *Archaea*, que abrangeram todas as amostras de DNA analisadas.

Uma vez que as amostras de sedimentos e solo apresentaram padrões físico-químicos diferentes, afetando diretamente na extração e concentração do DNA total, nas reações de qPCR as concentrações iniciais de DNA foram padronizadas para todas as amostras e o valor final da quantificação dos genes utilizados no presente estudo foram expressos em número de cópias por nanograma de DNA. Com isso, foi possível eliminar qualquer viés de análise relacionado aos diferentes padrões físico-químicos das amostras, em especial o teor de umidade.

5.4.1 Genes funcionais *mcrA* e *pmoA*

As curvas-padrão geradas para a utilização nas placas de qPCR do gene funcional *mcrA* apresentaram excelentes coeficientes de correlação, acima de $r^2=0,99$ e eficiência entre 87 e 93%. Os dados obtidos foram convertidos para número de cópias por nanograma de DNA e estão apresentados no Gráfico 4.

Gráfico 4 - Abundância do gene funcional *mcrA* nos sedimentos e solo estudados, nas duas épocas de amostragem.



As barras de erro representam o erro padrão da média. Letras minúsculas representam a comparação entre as áreas no mesmo período de amostragem e letras maiúsculas representam a comparação dos períodos de amostragem em cada área. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste Kruskal Wallis, a 5% de probabilidade.

Não ocorreu diferença significativa da quantificação do gene funcional *mcrA* nas áreas alagáveis entre as épocas de cheia e seca. A estabilidade das arqueias metanogênicas em relação à drenagem também foi relatada por Ma e Lu (2011). Vários trabalhos realizados em condições de campo indicam que a estrutura da comunidade metanogênica não se altera em relação às mudanças das condições ambientais em campos de arroz, com base em DNA (KRUGER et al., 2005; WATANABE; KIMURA; ASAKAWA, 2006; 2007). A razão pela qual a estrutura da comunidade metanogênica se mantém estável em áreas alagáveis ainda é desconhecida, no entanto, é importante ressaltar que a estabilidade da comunidade não reflete, necessariamente, os membros metabolicamente ativos (MA; LU, 2011; WATANABE; KIMURA; ASAKAWA, 2009).

A abundância do gene *mcrA* apresentou correlação positiva (0,570, $p < 0,05$) com pH e temperatura do sedimento/solo (0,607, $p < 0,05$). Apesar desse gene estar correlacionado significativamente com a produção e emissão de CH_4 , pode-se afirmar que há uma correlação indireta, uma vez que o pH e temperatura se correlacionaram positiva e significativamente com a emissão de CH_4 durante a época seca. Diferentemente do esperado, a quantificação do

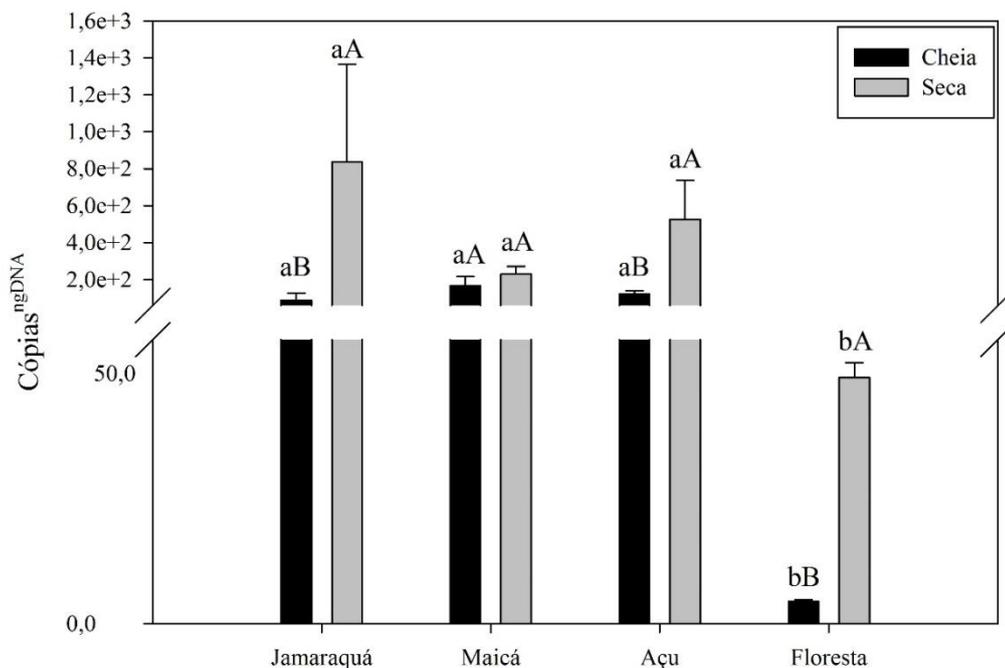
gene *mcrA* não apresentou correlação significativa com o teor de matéria orgânica, indicando que este não é um fator limitante para a comunidade metanogênica nas áreas estudadas.

De acordo com as análises de fluxo de gás CH₄ durante a época seca, a única área caracterizada como fonte de CH₄ é o igarapé Jamaraquá, que também apresentou maior abundância do gene *mcrA*, podendo ser um indicativo que a comunidade metanogênica dessa área se mantém ativa, mesmo em condições de drenagem natural.

Segundo Scavino et al. (2013), em solos de “terras altas”, ou seja, solos que não têm influência de períodos de inundação, a comunidade metanogênica só aumenta se for submetida a condições anóxicas de alagamento. Uma vez que a abundância do gene *mcrA* no solo de floresta se manteve abaixo de uma cópia^{ngDNA}, pode-se inferir que nessa área a comunidade metanogênica do solo da floresta utilizada nesse estudo é tão restrita que não é detectada pela técnica de qPCR.

As curvas-padrão geradas para a utilização nas placas de qPCR do gene funcional *pmoA* apresentaram bons coeficientes de correlação, acima de $r^2=0,98$ e eficiências entre 92 e 102%. Os dados obtidos foram convertidos para número de cópias por nanograma de DNA e estão apresentados no Gráfico 5.

Gráfico 5 - Abundância do gene funcional *pmoA* nos sedimentos e solo estudados, nas duas épocas de amostragem.



As barras de erro representam o erro padrão da média. Letras minúsculas representam a comparação entre as áreas no mesmo período de amostragem e letras maiúsculas representam a comparação dos períodos de amostragem em cada área. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste Kruskal Wallis, a 5% de probabilidade.

A abundância do gene funcional *pmoA* aumentou significativamente ($p < 0,05$) nas áreas alagáveis após a drenagem natural, exceto no igarapé Maicá, onde não apresentou diferença estatística. Durante a época cheia, o gene *pmoA* apresentou correlação significativa com o oxigênio dissolvido no sedimento (0,580, $p < 0,05$), confirmando o fato de que a disponibilidade de oxigênio no meio estimula a comunidade metanotrófica. O gene *pmoA* também apresentou forte correlação com o gene *mcrA* (0,759, $p < 0,05$), evidenciando a interação entre as comunidades metanotrófica e metanogênica nesses ambientes.

Outro aspecto importante é a relação *mcrA:pmoA* nas áreas de estudo. No solo de floresta, sempre há mais cópias de *pmoA* em relação ao número de cópias de *mcrA*, uma vez que o gene *mcrA* foi considerado como não detectado nessa área. Já nas áreas alagáveis, essa relação ocorre de forma contrária, porém a relação diminui na época seca, conforme a Tabela 6, que indica o número de cópias de *mcrA*^{ngDNA} para cada cópia de *pmoA*^{ngDNA} nas amostras de sedimentos.

Tabela 6 - Relação entre os genes *mcrA* e *pmoA* nas áreas alagáveis.

Áreas	Época cheia		Época seca	
	<i>mcrA</i>	<i>pmoA</i>	<i>mcrA</i>	<i>pmoA</i>
Jamaraquá	29,5	: 1	13,2	: 1
Maicá	20,5	: 1	10,2	: 1
Açu	41	: 1	8,7	: 1

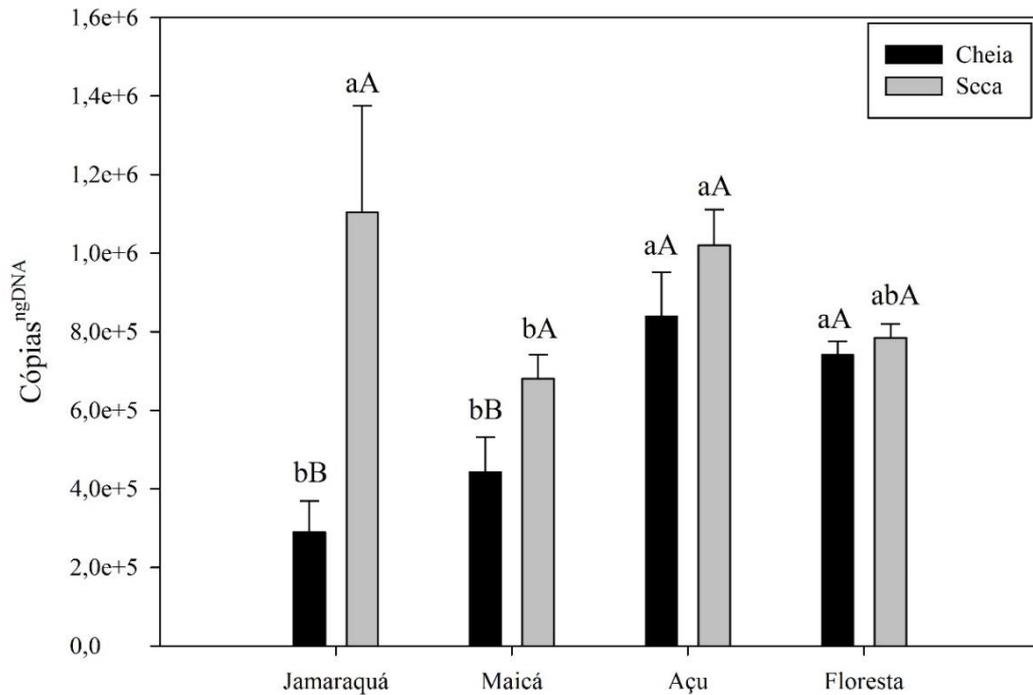
Dessa forma, pode-se inferir que a drenagem natural das áreas alagáveis permite a oxigenação do sedimento e resulta no crescimento mais elevado da comunidade metanotrófica em relação à comunidade metanogênica, evidenciando o potencial de oxidação de CH₄ nessas áreas. Contudo, somente a relação entre os genes não é suficiente para explicar a dinâmica de produção e oxidação de CH₄ nas áreas alagáveis, sendo um processo dependente de vários outros fatores, físicos, químicos e biológicos (MAYLAN et al., 2016; CHAUDHARY et al., 2017).

5.4.2 Genes 16S rRNA de *Bacteria* e *Archaea*

As curvas-padrão geradas para a utilização nas placas de qPCR do gene 16S rRNA *Bacteria* apresentaram bons coeficientes de correlação, acima de $r^2=0,95$ e eficiências entre

75 e 76%. Os dados obtidos foram convertidos para número de cópias por nanograma de DNA e estão apresentados no Gráfico 6.

Gráfico 6 - Abundância do gene marcador filogenético 16S rRNA *Bacteria* nos sedimentos e solo estudados, nas duas épocas de amostragem.

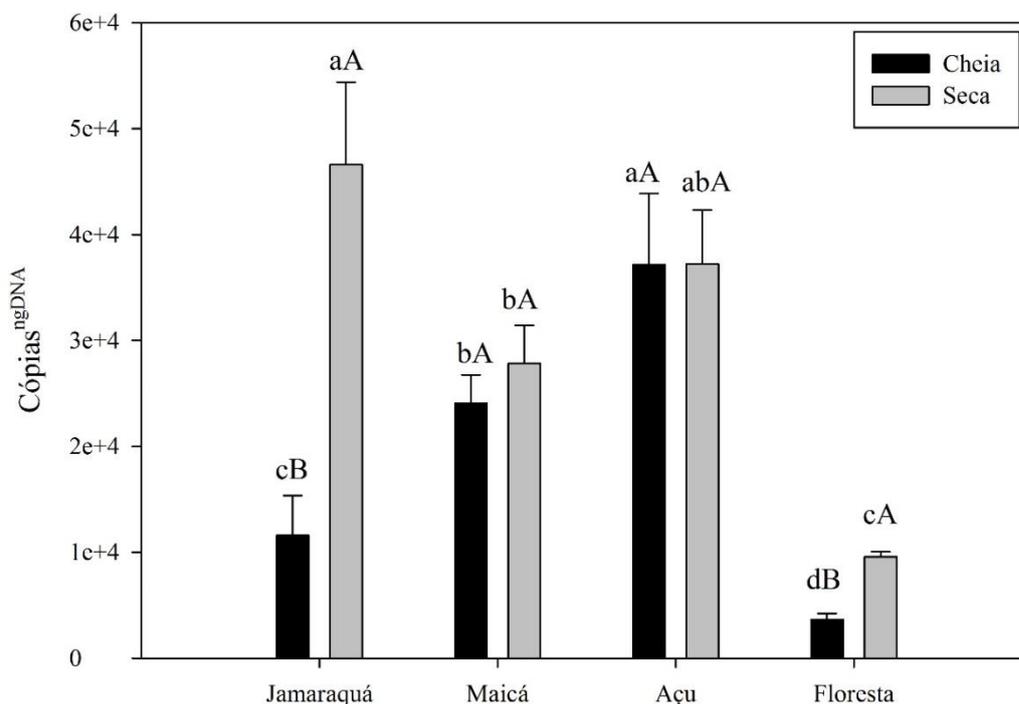


As barras de erro representam o erro padrão da média. Letras minúsculas representam a comparação entre as áreas no mesmo período de amostragem e letras maiúsculas representam a comparação dos períodos de amostragem em cada área. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste Kruskal Wallis, a 5% de probabilidade.

Em todas as áreas, houve aumento da abundância do gene 16S rRNA *Bacteria* no período de seca em relação ao período de cheia, sendo estatisticamente significativo somente nos igarapés Jamaraquá e Maicá. A drenagem natural da água e a consequente exposição do sedimento ao oxigênio torna-se uma condição favorável para o aumento da comunidade *Bacteriana* (JI et al., 2015). Já na Floresta, a abundância do domínio *Bacteria* se manteve constante, indicando que essa área representa um ambiente estável para a comunidade *Bacteriana*.

As curvas-padrão geradas para a utilização nas placas de qPCR do gene 16S rRNA de *Archaea* apresentaram excelentes coeficientes de correlação, acima de $r^2=0,99$ e eficiências entre 90 e 99%. Os dados obtidos foram convertidos para número de cópias por nanograma de DNA e estão apresentados no Gráfico 7.

Gráfico 7 - Abundância do gene marcador filogenético 16S rRNA *Archaea* nos sedimentos e solo estudados, nas duas épocas de amostragem.



As barras de erro representam o erro padrão da média. Letras minúsculas representam a comparação entre as áreas no mesmo período de amostragem e letras maiúsculas representam a comparação dos períodos de amostragem em cada área. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste Kruskal Wallis, a 5% de probabilidade.

É possível observar diferenças acentuadas na abundância de microrganismos do Domínio *Archaea*. Em relação às épocas amostradas, as áreas apresentaram padrões diferentes, uma vez que o igarapé Jamaraquá e a floresta tiveram um aumento significativo na abundância do gene 16S rRNA *Archaea*. Em contrapartida, os igarapés Maicá e Açú não apresentaram diferenças significativas entre as épocas. A abundância do gene 16S rRNA *Archaea* está fortemente correlacionada com a abundância do gene funcional *mcrA* (0,829, $p < 0,05$). Em áreas alagáveis, é comum se utilizar ambos os genes, em conjunto, para indicar o potencial de emissão de CH₄ (SCAVINO et al., 2013; JI et al., 2015). Em relação às variáveis ambientais, a abundância do gene 16S rRNA *Archaea*, assim como o gene *mcrA*, apresentou correlação significativa com pH (0,373, $p < 0,05$) e temperatura do sedimento/solo (0,607, $p < 0,05$).

A abundância do gene 16S rRNA *Archaea* apresentou correlação 0,437 ($p < 0,05$) com a abundância do gene 16S rRNA *Bacteria*, indicando que interação positiva entre os dois domínios. A comunidade bacteriana apresentou maior quantificação em relação à comunidade de arqueias em todas as áreas nas duas épocas, sendo a relação bactéria:arqueia bem menor nas áreas alagáveis, como pode ser observado na Tabela 7, que indica o número de cópias de

16S rRNA *Bacteria*^{ngDNA} para cada cópia de 16S rRNA *Archaea*^{ngDNA} nas amostras de sedimentos e solo de floresta.

Tabela 7 - Relação entre os genes *Bacteria* e *Archaea* nas áreas de estudo

Áreas	Época cheia		Época seca	
	16S <i>Bacteria</i>	16S <i>Archaea</i>	16S <i>Bacteria</i>	16S <i>Archaea</i>
Jamaraquá	26,9	:	1	23,2 : 1
Maicá	18,3	:	1	26,2 : 1
Açu	25,7	:	1	28,3 : 1
Floresta	222,2	:	1	82,2 : 1

Este fato pode estar relacionado à adaptação da comunidade total de arqueias para se desenvolver em ambientes sujeitos a estresses sazonais, tais como os períodos de cheia e seca.

5.5 Sequenciamento em larga escala dos genes 16S rRNA de *Bacteria* e *Archaea*

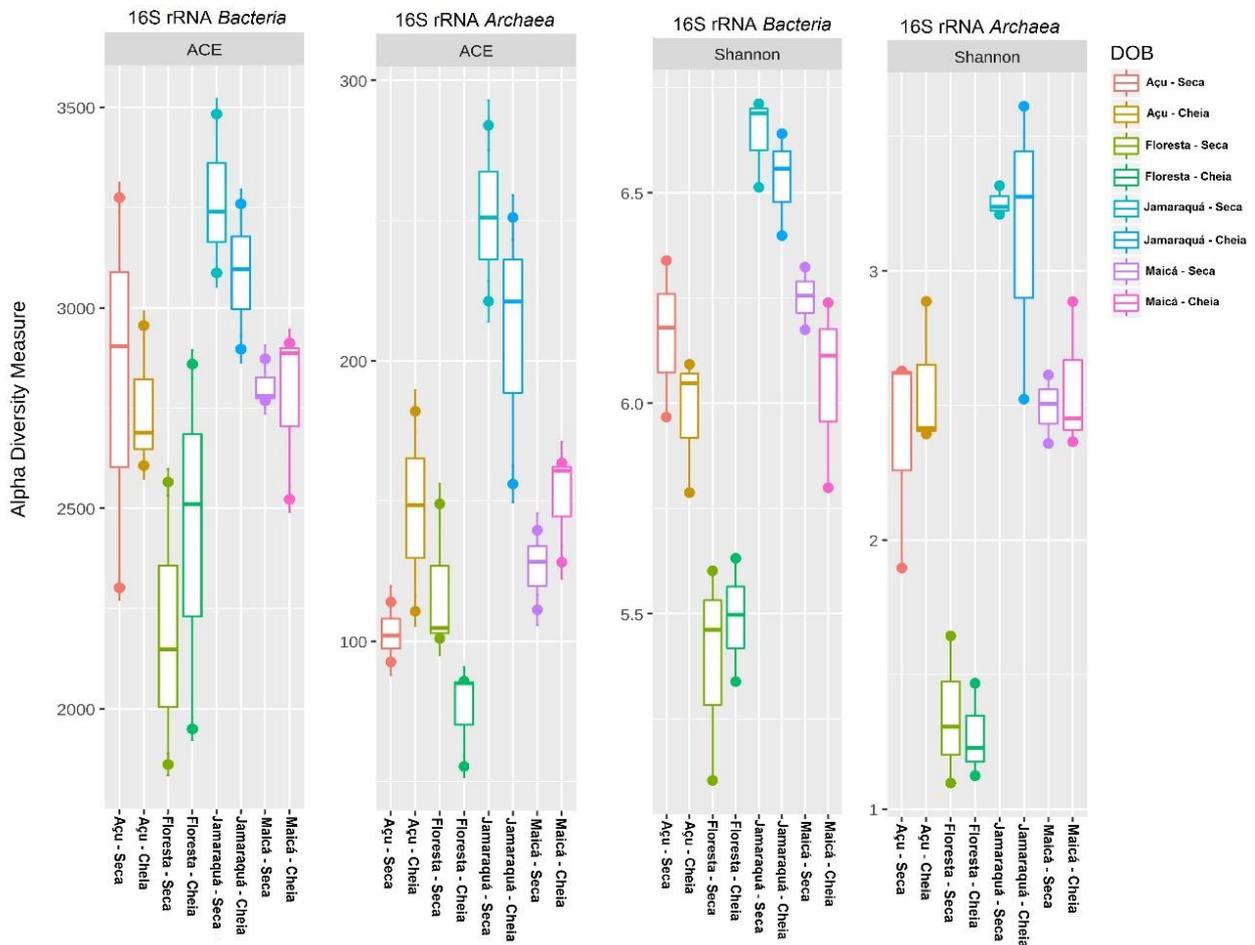
O sequenciamento em larga escala dos genes 16S rRNA de *Archaea* e *Bacteria* foram realizados concomitantemente e de modo complementar às análises de qPCR, objetivando a determinação dos índices de riqueza e diversidade e perfis taxonômicos das comunidades de *Bacteria* e *Archaea* nas amostras de sedimentos e solo do presente estudo.

O sequenciamento dos genes 16S rRNA de *Bacteria* e *Archaea* realizado pela plataforma Illumina Hiseq 2500 (PE250) gerou um total de 4.014.872 sequências brutas de *Bacteria* e 1.108.165 sequências brutas de *Archaea*. Após o controle de qualidade de sequências, este número foi reduzido para 2.985.763 sequências de *Bacteria* e 584.144 sequências de *Archaea*, com tamanho médio de 253 e 360 pb, respectivamente. As sequências resultantes foram agrupadas em 14.137 OTUs de *Bacteria* e 493 OTUs de *Archaea*.

5.5.1 Estimativas de riqueza e medidas de diversidade

A partir do cálculo do estimador ACE e índice Shannon, foi possível observar que as áreas do presente estudo apresentaram padrões distintos de riqueza e diversidade, tanto para *Bacteria* quanto para *Archaea*, conforme o gráfico 8.

Gráfico 8 - Estimativa de riqueza e medida de diversidade das áreas de estudo nas duas épocas de amostragem.



A riqueza e consequentemente a diversidade de espécies microbianas em um habitat está relacionada às características do ambiente, incluindo não somente disponibilidade de nutrientes em si, mas também a forma como estão estes encontrados, pH e disponibilidade de oxigênio (MADIGAN et al., 2014; MAYLAN et al., 2016), portanto, como as áreas apresentam padrões físico-químicos distintos e, adicionalmente, houve mudanças nas características das áreas de uma época para outra, já era de se esperar alterações nos estimadores de riqueza e medidas de diversidade OTUs entre as épocas nas áreas de estudo.

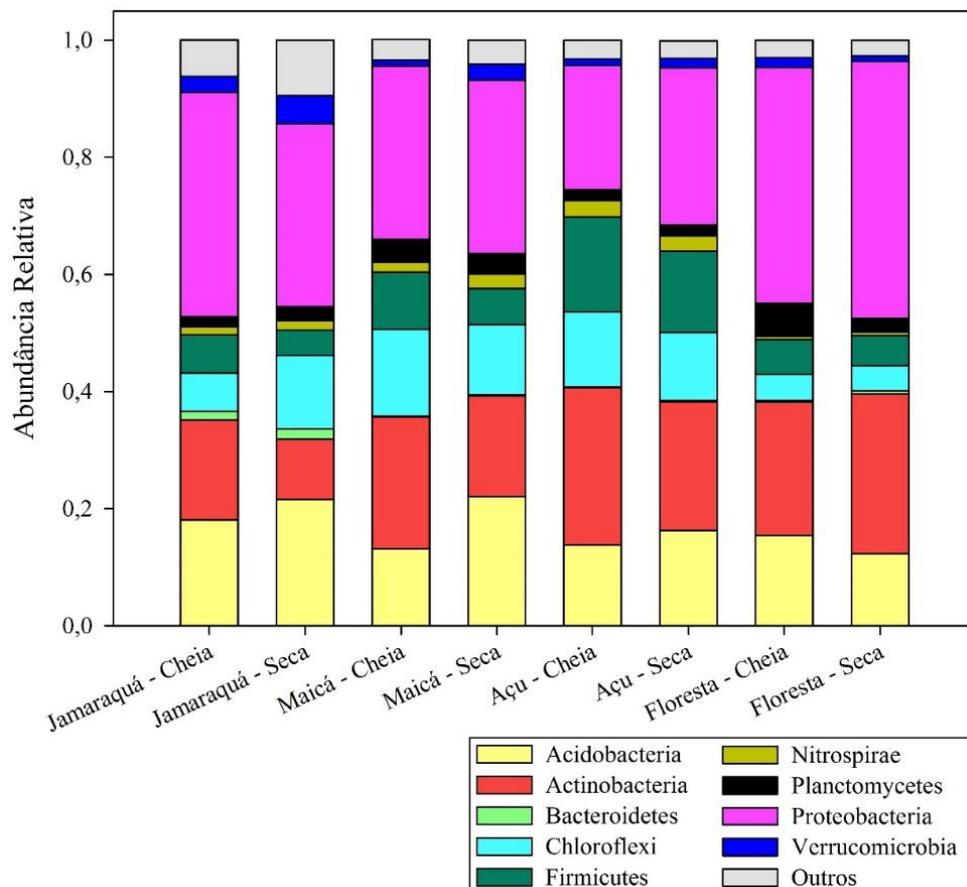
Independentemente da época de amostragem, as amostras de sedimento das áreas alagáveis apresentaram maior riqueza e diversidade de OTUs nos domínios *Bacteria* e *Archaea* em relação às amostras de solo de floresta, ocorrendo uma discrepância muito maior para arqueias. Uma vez que as áreas alagáveis estão sujeitas a períodos contrastantes de seca e cheia, o que altera drasticamente as condições do ambiente, os maiores índices de riqueza e

diversidade nessas áreas pode estar relacionado a abertura constante e dinâmica de novos nichos, devido às perturbações naturais, o que não ocorre com a mesma intensidade em solos sob floresta. Adicionalmente, é possível observar a semelhança dos índices de riqueza e diversidade dos igarapés Maicá e Açu quando comparados ao igarapé Jamaraquá. Esses dados evidenciam ainda mais a influência das características dos rios na formação da comunidade microbiana em áreas alagáveis.

5.5.2. Perfis taxonômicos das comunidades de *Bacteria* e *Archaea*

O sequenciamento do gene 16S rRNA *Bacteria* revelou que as quatro áreas de estudo apresentam perfis taxonômicos do domínio *Bacteria* semelhantes, independentemente da época, com presença representativa dos filos *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Chloflexi*, *Firmicutes*, *Nitrospirae*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia* e com exceção do filo *Bacterioidetes* que apresentou presença representativa somente no igarapé Jamaraquá e no solo de floresta durante a época cheia, conforme o Gráfico 9.

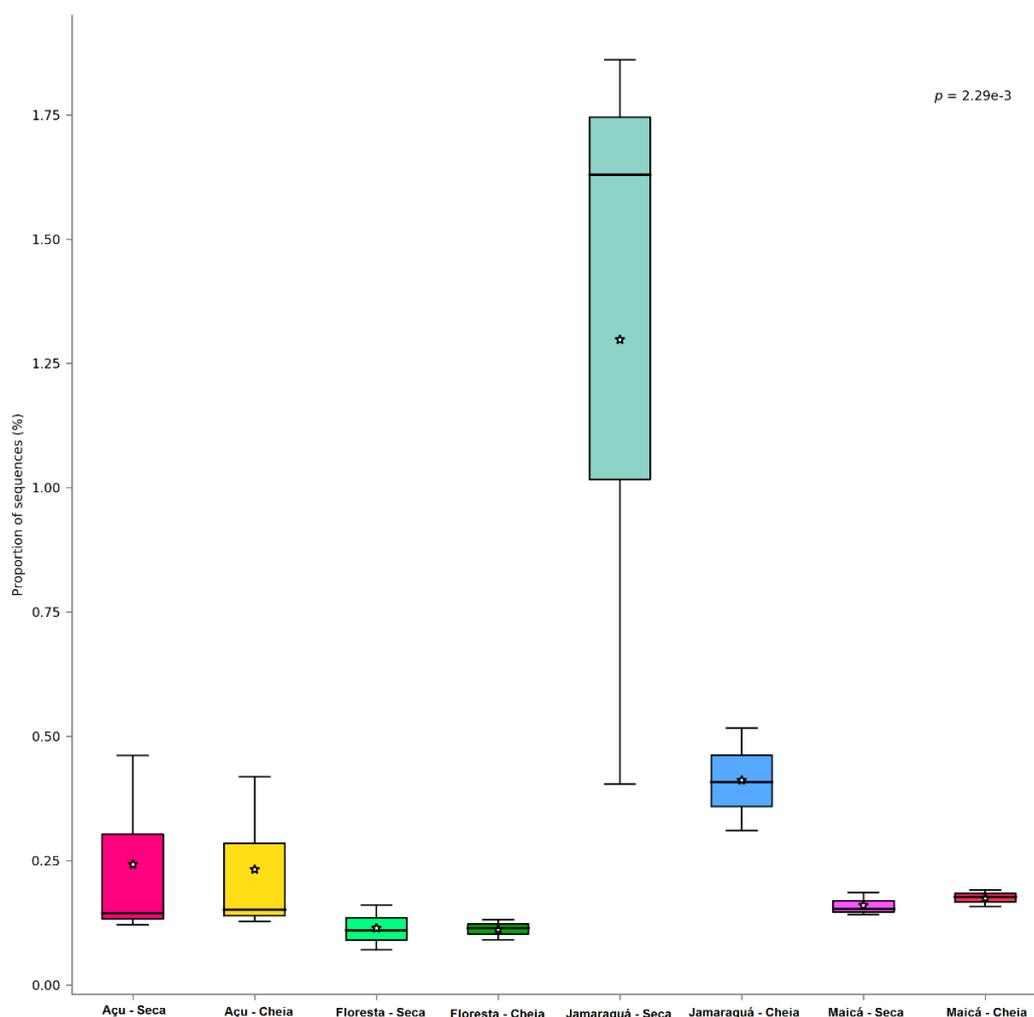
Gráfico 9 - Perfil taxonômico do domínio *Bacteria* das áreas de estudo nas duas épocas de amostragem



A presença e representatividade dos filos do domínio *Bacteria* detectados já foi amplamente descrita em vários trabalhos, tanto em sedimentos de áreas alagáveis quanto em solos amazônicos (RODRIGUES et al., 2013; HE et al., 2015).

O filo *ProteoBacteria*, composto por bactérias gram-negativas, é um dos maiores filos do domínio *Bacteria*. Dentre as cinco classes deste filo, a classe *Gammaproteobacteria* merece destaque por abrigar família *Methylococcaceae*, relacionada às bactérias metanotróficas tipo I, quantificadas no presente estudo pelo gene *pmoA*. A abundância relativa das OTUs classificadas na família *Methylococcaceae*, com maior representatividade dentre as famílias potencialmente oxidadoras de CH₄ no sequenciamento do gene 16S rRNA *Bacteria* do presente trabalho, está representada no Gráfico 10.

Gráfico 10 - Abundância relativa da família *Methylococcaceae* nas áreas de estudo nas duas épocas de amostragem

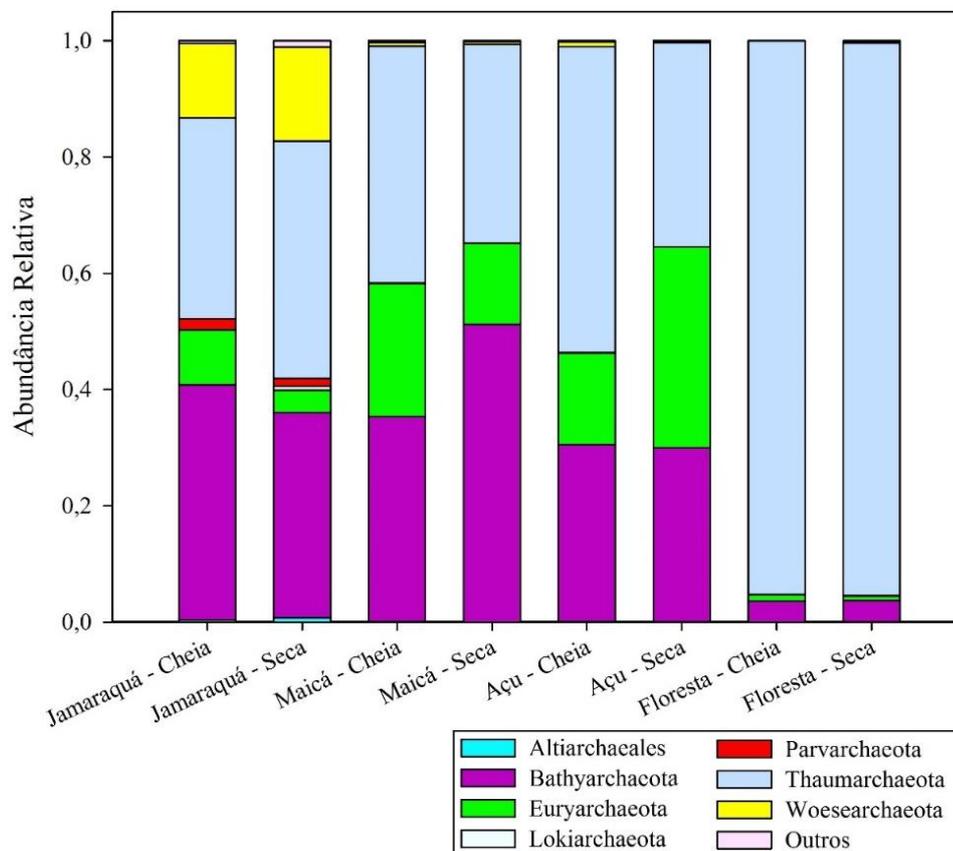


A abundância relativa das OTUs classificadas na família *Methylococcaceae* a partir do sequenciamento do gene 16S rRNA *Bacteria* corrobora com os valores de abundância do gene

pmoA à partir da técnica de qPCR, indicando que esta é a principal família relacionada a este gene funcional tanto nas áreas alagáveis quanto em solo de floresta. A presença dessa família indica que todas as áreas possuem potencial para atuarem como dreno de CH₄, levando em consideração que a emissão de CH₄ é resultado do balanço entre sua produção e oxidação (MARINHO et al., 2016), e ambos os processos necessitam de condições específicas para ocorrer.

Em contrapartida, o sequenciamento do gene 16S rRNA *Archaea* revelou que os sedimentos apresentam perfis taxonômicos distintos do solo de floresta. Enquanto a comunidade de arqueias do solo de floresta é majoritariamente composta por representantes do filo *Thaumarchaeota*, e em menor abundância os filios *Bathyarchaeota* e *Euryarchaeota*, nos sedimentos a comunidade de arqueias é mais bem distribuída entre esses três filios e, adicionalmente, o igarapé Jamaraquá, considerada a área mais diversa pelo índice de Shannon, apresentou OTUs classificadas no filo *Parvachaeota*, *Wosearchaeota* e, somente durante a época seca, *AltiArchaeales* e *Lokiarchaeota*, conforme o Gráfico 11.

Gráfico 11 - Perfil taxonômico do domínio *Archaea* das áreas de estudo nas duas épocas de amostragem

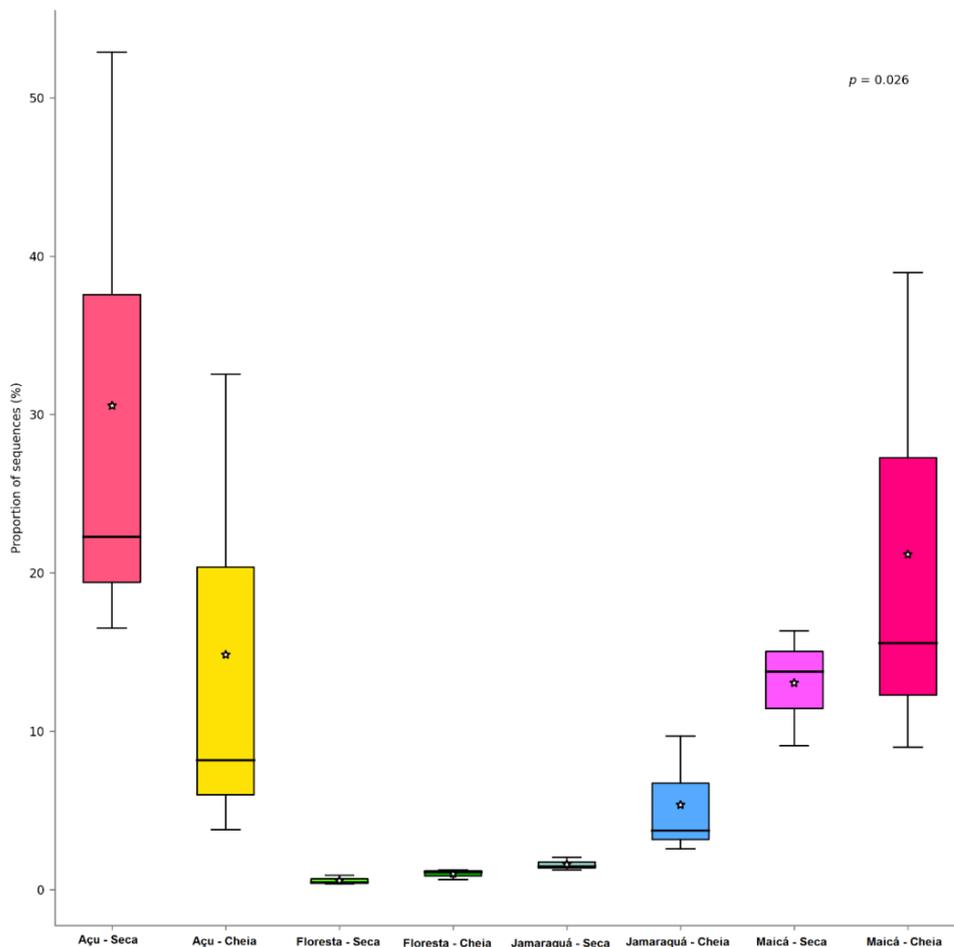


O filo *Thaumarchaeota* está entre um dos mais abundantes filios de arqueias. Inicialmente classificado como "Crenarchaeota mesofílico", análises de genômica

comparativa revelou recentemente ser um filo separado e de ramificação profunda dentro do domínio *Archaea*. Este novo filo compreende não somente as arqueias oxidantes de amônio conhecidas, mas também vários clusters de sequências ambientais representando microrganismos com metabolismo de energia desconhecida (PESTER et al., 2011).

Apesar da ocorrência difundida e da diversidade fisiológica em ecossistemas terrestres, o filo *Euryarchaeota* ainda é pouco explorado, contendo microrganismos psicrófilos, termófilos, mesófilos, halófilos e alcalófilos, principalmente com propriedades metabólicas não resolvidas (PESARO; WIDMER, 2002; HU et al., 2013). O filo *Euryarchaeota* é conhecido por abrigar gêneros conhecidos de importância na produção de gases de efeito estufa, com o CH₄ como o produto final da respiração anaeróbica, sendo este processo biológico considerado responsável pelo 74% do CH₄ atmosférico emitido na Terra (LIU; WHITMAN, 2008). Dentre os gêneros metanogênicos classificados junto ao filo *Euryarchaeota*, o gênero com maior representatividade identificado pelo sequenciamento do gene 16S rRNA *Archaea* foi o gênero *Methanobacterium*, conforme o Gráfico 12.

Gráfico 12 - Abundância relativa do gênero *Methanobacterium* nas áreas de estudo nas duas épocas de amostragem



Atualmente, o gênero *Methanobacterium* compreende 25 espécies originárias de vários ambientes, bem como estirpes que ainda não foram validamente nomeadas, mas pertencem ao gênero *Methanobacterium* com base na sua sequência de genes 16S rRNA semelhante ao tipo de cepas deste gênero. Todas as espécies de *Methanobacterium* conhecidas até agora são capazes de utilizar dióxido de CO₂ e H₂ como substratos para a metanogênese, se enquadrando no metabolismo hidrogenotrófico. Além disso, apresentam uma ampla gama de fenótipos e variações quanto às suas especificações genômicas (CADILLO-QUIROZ et al., 2014). A abundância desse gênero foi consideravelmente maior nas áreas alagáveis, em especial nos igarapés Maicá e Açu, quando comparada ao solo de floresta evidenciando o potencial de atuarem também como fonte de CH₄. Já a baixa abundância relativa desse gênero no igarapé Jamaraquá em relação às outras áreas alagáveis indica que parte do gene *mcrA* amplificado pela técnica de qPCR advém de outros grupos ainda não classificados.

O filo de *Bathyarchaeota* foi proposto recentemente, representando um grupo evolutivamente diverso de microrganismos (KUBO et al., 2012; GAGEN et al., 2013; MENG et al., 2014; LAZAR et al., 2015) encontrados em diversos ambientes, incluindo sedimentos de oceanos e água doce (VETRIANI et al., 1999; LLOYD et al., 2013; MENG et al., 2014). A alta abundância de genes do RNA ribossômico 16S (rRNA) e de biomarcadores lipídicos nas regiões de transição sulfato-metano levou à especulação de que membros desta linhagem podem estar envolvidos na oxidação anaeróbica dissimilatória do CH₄, acoplada à assimilação de carbono orgânico (BIDDLE et al., 2006). Recentemente, Evans et al. (2015) recuperaram genomas de duas linhagens do filo *Bathyarchaeota* em um aquífero Australiano, encontrando genes responsáveis pela produção e oxidação anaeróbica de CH₄ homólogos aos genes presentes no filo *Euryarcheota*, principalmente o gene *mcrA*, porém filogeneticamente divergentes. Dada a ampla diversidade ambiental e filogenética de *Bathyarchaeota*, e diante da importância desse filo nas áreas alagáveis na região de Santarém-PA, estudos adicionais são necessários para entender as capacidades metabólicas deste filo pouco conhecido.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir das amostragens de gases, foi possível observar que as áreas alagáveis possuem potencial de atuarem como fonte de CH₄ durante a época cheia, e como fonte ou dreno de CH₄ durante a época seca.

Os dados de qPCR confirmaram o potencial das áreas alagáveis de atuarem como tanto como fonte quanto como dreno de CH₄, uma vez que a abundância do gene *pmoA* aumenta durante a época seca. Já no solo de floresta, o gene *mcrA* foi considerado como não detectado, portanto, a floresta pode ser considerada somente como potencial dreno de CH₄.

O estimador de riqueza ACE e o índice de diversidade de Shannon mostraram que os sedimentos de áreas alagáveis possuem maior riqueza e diversidade de *Bacteria* e *Archaea* quando comparados ao solo de floresta, indicando que as dinâmicas de alagamento e drenagem naturais podem ser responsáveis pela abertura de novos nichos ecológicos que consequentemente influenciam no aumento da riqueza e diversidade de *Bacteria* e *Archaea* nessas áreas.

Todas as áreas apresentaram perfis taxonômicos do domínio *Bacteria* semelhantes, com exceção de alguns filos, porém, a grande diferença entre as comunidades está relacionada ao Domínio *Archaea*. A comunidade de arqueias no solo de floresta é majoritariamente composta por representantes do filo *Thaumarchaeota*, independentemente da época de amostragem, indicando a estabilidade desse filo em solo de floresta.

O solo de floresta apresentou baixa abundância dos filos potencialmente produtores de CH₄, *Bathyarchaeota* e *Euryarchaeota*, e o contrário foi observado nas áreas alagáveis. A maior abundância do filo *Bathyarchaeota* em relação ao filo *Euryarchaeota* nas áreas alagáveis revelou que o pouco do que se conhece acerca do metabolismo metanogênico pode ser levado em consideração para a caracterização das áreas alagáveis da Amazônia utilizadas no presente estudo, uma vez que o filo *Bathyarchaeota* foi recentemente descrito e necessita de maiores estudos para compreensão dos metabolismos utilizados pelos integrantes desse filo.

Os dados gerados no presente estudo incentivam a continuidade de trabalhos relacionados ao ciclo do CH₄ em áreas alagáveis da bacia Amazônica, incluindo investigações acerca do papel do filo *Bathyarchaeota* nessas áreas. Para o entendimento dos processos e da dinâmica das comunidades microbianas envolvidas nos mesmos, poderão ser desenvolvidos modelos para experimentos em microcosmos, a fim de simular um ambiente controlado com foco específico no ciclo do CH₄, e, adicionalmente, utilização de técnicas refinadas como

metagenômica, metatranscritômica e fracionamento isotópico para responder perguntas relacionadas à função da comunidade microbiana nessas áreas.

REFERÊNCIAS

ALLEN, A.E. et al. Influence of nitrate availability on the distribution and abundance of heterotrophic bacterial nitrate assimilation genes in the Barents Sea during summer. **Aquatic Microbial Ecology**, Luhe, v. 39, n. 3, p. 247-255, 2005.

ARONSON, E.L. et al. Environmental impacts on the diversity of methane-cycling microbes and their resultant function. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 4, art. 225, 2013.

BATES, S.T. et al. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. **The ISME Journal**, London, v. 5, n. 5, p. 908-917, 2011.

BIDDLE, J.F. et al. Heterotrophic *Archaea* dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 103, n. 10, p. 3846-3851, 2006.

BINTRIM, S.B. et al. Molecular phylogeny of Archaea from soil. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 94, p. 277-282, 1997.

BODEGOM, P. et al. Methane oxidation and the competition for oxygen in the rice rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 67, n. 8, p. 3586-3597, 2001.

BORREL, G. et al. Stratification of Archaea in the deep sediments of a freshwater meromictic lake: vertical shift from methanogenic to uncultured archaeal lineages. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 8, p. e43346, 2012.

BRIDGHAM, S.D. et al. Methane emissions from wetlands: biogeochemical, microbial, and modeling perspectives from local to global scales. **Global Change Biology**, Oxford, v. 19, n. 5, p. 1325-1346, 2013.

BRODY, J.R.; KERN, S.E. Sodium boric acid: atriz-less, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**, Natick, v. 36, p. 214-216, 2004.

CADILLO-QUIROZ, H. et al. *Methanobacterium paludis* sp. nov. and a novel strain of *Methanobacterium lacus* isolated from northern peatlands. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 64, n. 5, p. 1473-1480, 2014.

CALDWELL, S.L. et al. Anaerobic oxidation of methane: mechanisms, bioenergetics, and the ecology of associated microorganisms. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 42, n. 18, p. 6791-6799, 2008.

CANHOS, V.P.; VAZOLLER, R.F. Microrganismos & vírus. In: JOLY, C.A.; BICUDO, C.E.M. (Org.). **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX**. São Paulo: FAPESP, 1999. p. 3-23.

CAPORASO, J.G. et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 108, n. Supplement 1, p. 4516-4522, 2011.

CHAUDHARY, P.; RULÍK, M.; BLASER, M. Is the methanogenic community reflecting the methane emissions of river sediments? Comparison of two study sites. **MicrobiologyOpen**, Oxford, 2017.

CHEN, H. et al. **Methane emissions from unique wetlands in China**: case studies, meta analyses and modelling. Berlin: Walter de Gruyter GmbH, 2015.

CHOWDHURY, T.R.; DICK, R.P. Ecology of aerobic methanotrophs in controlling methane fluxes from wetlands. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 65, p. 8-22, 2013.

CIAIS, P. et al. Carbon and other biogeochemical cycles. In: IPCC. **Climate Change 2013**: the physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge: Cambridge University Press, 2014. p. 465-570.

CONRAD, R. Microbial ecology of methanogens and methanotrophs. **Advances in Agronomy**, New York, v. 96, p. 1-63, 2007.

CONRAD, R. The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. **Environmental Microbiology Reports**, Hoboken, v. 1, n. 5, p. 285–92, 2009.

COSTELLO, A.; LIDSTROM, M. Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 65, n. 11, p. 5066–5074, 1999.

COUTINHO, H.L.C. et al. Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological innovations. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 71, n. 3, p. 491-503, 1999.

CRILL, P.M. et al. Methane flux from Minnesota peatlands. **Global Biogeochemical Cycles**, Washington, DC, v. 2, n. 4, p. 371-384, 1988.

DEDYSH, S.N. et al. *Methylocella palustris* gen. nov., sp. nov., a new methane-oxidizing acidophilic bacterium from peat bogs, representing a novel subtype of serine-pathway methanotrophs. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 50, p. 955-969, 2000.

DEDYSH, S.N.; DUNFIELD, P.F. 3 Facultative and Obligate Methanotrophs: How to Identify and Differentiate Them. **Methods in Enzymology**, New York, v. 495, p. 31-44, 2011.

DEVOL, A.H. et al. **Environmental methane in the Amazon river floodplain**. Global Wetlands: Old World and New, 1994. p. 151-165.

DEVOL, A.H. et al. Seasonal dynamics in methane emissions from the Amazon River floodplain to the troposphere. **Journal of Geophysical Research**, Richmond, v. 95, n. D10, p. 16417-16426, 1990.

DLUGOKENCKY, E. J. et al. Observational constraints on recent increases in the atmospheric CH₄ burden. **Geophysical Research Letters**, Washington, DC, v. 36, n. 18, 2009.

DOUTERELO, I. et al. Methodological approaches for studying the microbial ecology of drinking water distribution systems. **Water Research**, Oxford, v. 65, p. 134-156, 2014.

EDGAR, R.C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. **Nature Methods**, London, v. 10, n. 10, p. 996-998, 2013.

ERCOLINI, D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.56, p.297-314, 2004.

EVANS, P.N. et al. Methane metabolism in the archaeal phylum Bathyarchaeota revealed by genome-centric metagenomics. **Science**, Washington, DC, v. 350, n. 6259, p. 434–437, 2015.

FENCHEL, T. et al. **Bacterial biogeochemistry: the ecophysiology of mineral cycling**. 3. ed. San Diego: Academic Press, 2012.

FERREIRA, S.J.F. et al. Nutrientes na solução do solo em floresta de terra firme na Amazônia Central submetida à extração seletiva de madeira. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 36, p. 59-68, 2006.

FURCH, K.; JUNK, W.J. Physicochemical conditions in the floodplains. In: _____. (Ed.). **The Central Amazon Floodplain**. Berlin: Springer, 1997. cap. 4, p. 69-108.

GAGEN, E.J. et al. Novel cultivation-based approach to understanding the miscellaneous crenarchaeotic group (MCG) archaea from sedimentary ecosystems. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 79, n. 20, p. 6400-6406, 2013.

HAKEMIAN, A.S.; ROSENZWEIG, A.C. The biochemistry of methane oxidation. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 76, p. 223-241, 2007.

HANSON, R.S.; HANSON, T.E. Methanotrophic Bacteria. **Microbiological Reviews**, Washington, DC, v. 60, n. 2, p. 439–471, 1996.

HAQUE, M.M. et al. Suppressing methane emission and global warming potential from rice fields through intermittent drainage and green biomass amendment. **Soil Use and Management**, Wallingford, v. 32, p. 72-79, 2016.

HE, S. et al. Patterns in wetland microbial community composition and functional gene repertoire associated with methane emissions. **MBio**, Washington, DC, v. 6, n. 3, p. e00066-15, 2015.

HOFMANN, K. et al. Abundance and potential metabolic activity of methanogens in well-aerated forest and grassland soils of an alpine region. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 92, n.2, 2016. doi: 10.1093/femsec/fiv171.

HOLMES, A.J. et al. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 132, p. 203-208, 1995.

HOUGHTON, R.A. Aboveground forest biomass and the global carbon balance. **Global Change Biology**, Oxford, v. 11, n. 6, p. 945-958, 2005.

HU, H.W. et al. Contrasting Euryarchaeota communities between upland and paddy soils exhibited similar pH-impacted biogeographic patterns. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 64, p. 18-27, 2013.

ILLUMINA. **HiSeq® 2500 Sequencing System**. Unsurpassed power and efficiency for production scale sequencing. San Diego, 2015. 4 p.

IPCC. **Climate change 2013: the physical science basis**. Contribution of working group I to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge: Cambridge University Press, 2013.

IXON, P. VEGAN, a package of R functions for community ecology. **Journal of Vegetation Science**, Knivsta, Sweden, v. 14, n. 6, p. 927-930, 2003.

JI, Y. et al. Functional and structural responses of methanogenic microbial communities in Uruguayan soils to intermittent drainage. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 89, p. 238-247, 2015.

JUNK, W.J. et al. A classification of major natural habitats of Amazonian white-water river floodplains (várzeas). **Wetlands Ecology and Management**, The Hague, v. 20, n. 6, p. 461-475, 2012.

JUNK, W.J. et al. A classification of major naturally-occurring Amazonian lowland wetlands. **Wetlands**, Heidelberg, v. 31, n. 4, p. 623-640, 2011.

JUNK, W.J. et al. **Definição e classificação das Áreas Úmidas (AUs) brasileiras**: base científica para uma nova política de proteção e manejo sustentável. Cuiabá: CPP/INAU, 2013.

JUNK, W.J. **The central Amazon floodplain**: Ecology of a pulsing system. Berlin: Springer, 1997. 520 p.

KIM, J. et al. Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: applications and considerations. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 31, n. 8, p. 1358-1373, 2013.

KLINDWORTH, A. et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic Acids Research**, London, v. 41, n. 1, doi: 10.1093/nar/gks808, 2012.

KRÜGER, M. et al. Activity, structure and dynamics of the methanogenic archaeal community in a flooded Italian rice field. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 51, n. 3, p. 323-331, 2005.

KUBO, K. et al. Archaea of the Miscellaneous Crenarchaeotal Group are abundant, diverse and widespread in marine sediments. **The ISME Journal**, London, v. 6, n. 10, p. 1949-1965, 2012.

LANE, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. Chichester: John Wiley & Sons, 1991. p. 115-175.

LAZAR, C.S. et al. Environmental controls on intragroup diversity of the uncultured benthic archaea of the miscellaneous Crenarchaeotal group lineage naturally enriched in anoxic sediments of the White Oak River estuary (North Carolina, USA). **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 17, n. 7, p. 2228-2238, 2015.

LIM, J. et al. Design and use of group-specific primers and probes for real-time quantitative PCR. **Frontiers of Environmental Science & Engineering**, Beijing, v. 5, n. 1, p. 28-39, 2011.

LIU, Y.; WHITMAN, W.B. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1125, n. 1, p. 171-189, 2008.

LLOYD, K.G. et al. Predominant archaea in marine sediments degrade detrital proteins. **Nature**, London, v. 496, n. 7444, p. 215-218, 2013.

LUTON, P.E. et al. The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. **Microbiology**, Reading, v. 148, n. 11, p. 3521-3530, 2002.

MA, K.; LU, Y. Regulation of microbial methane production and oxidation by intermittent drainage in rice field soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 75, n. 3, p. 446-456, 2011.

MADIGAN, M.T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. San Francisco: Benjamin-Cummings Publishing, 2014. 1032 p.

MALYAN, S.K. et al. Methane production, oxidation and mitigation: a mechanistic understanding and comprehensive evaluation of influencing factors. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 572, p. 874-896, 2016.

MARINHO, C.C. et al. Impactos antrópicos nas lagoas costeiras do norte do estado do Rio de Janeiro: uma revisão sobre a eutrofização artificial e gases de efeito estufa. **RBPG. Revista Brasileira de Pós-Graduação**, Brasília, DF, v. 13, n. 32, p. 703-728, 2016.

MCCAIG, A.E. et al. Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 65, n. 4, p. 1721-1730, 1999.

MENG, J. et al. Genetic and functional properties of uncultivated MCG archaea assessed by metagenome and gene expression analyses. **The ISME Journal**, London, v. 8, n. 3, p. 650-659, 2014.

MIRANDA, R.G. et al. Qualidade dos recursos hídricos da Amazônia-Rio Tapajós: avaliação de caso em relação aos elementos químicos e parâmetros físico-químicos. **Revista Ambiente & Água**, Taubaté, v. 4, n. 2, p. 75-92, 2009.

MOHANTY, S.R. Effect of temperature on composition of the methanotrophic community in rice field and forest soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 62, n. 1, p. 24-31, 2007.

MOREIRA-TURCQ, P. et al. Exportation of organic carbon from the Amazon River and its main tributaries. **Hydrological Processes**, Chichester, v. 17, n. 7, p. 1329-1344, 2003.

MOURA, J.M.S. **Variação na composição isotópica do metano (CH₄) em sedimentos de igarapés na Amazônia oriental**. 2005. 84 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

NAKAYAMA, C.R. et al. Revealing archaeal diversity patterns and methane fluxes in Admiralty Bay, King George Island, and their association to Brazilian Antarctic Station activities. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, Oxford, v. 58, n. 1-2, p. 128-138, 2011.

NARIHIRO, T.; SEKIGUCHI, Y. Oligonucleotide primers, probes and molecular methods for the environmental monitoring of methanogenic archaea. **Microbial Biotechnology**, Oxford, v. 4, n. 5, p. 585-602, 2011.

NARROWE, A.B. et al. High-resolution sequencing reveals unexplored archaeal diversity in freshwater wetland soils. **Environmental Microbiology**, Oxford, 2017. doi: 10.1111/1462-2920.13703.

NAZARIES, L. et al. Methane, microbes and models: fundamental understanding of the soil methane cycle for future predictions. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 15, n. 9, p. 2395-417, 2013.

NEVES, E.J.M. Deposição de serapilheira e de nutrientes de duas espécies da Amazônia. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, v. 43, p. 47-60, 2001.

NOVAIS, C.M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real: Uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase (PCR). **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, DF, p. 10-13, 2004.

PAZINATO, J.M. et al. Molecular Characterization of the Archaeal Community in an Amazonian Wetland Soil and Culture-Dependent Isolation of Methanogenic Archaea. **Diversity**, Basel, v. 2, n. 7, p. 1026-1047, 2010.

PESARO, M.; WIDMER, F. Identification of novel Crenarchaeota and Euryarchaeota clusters associated with different depth layers of a forest soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 42, n. 1, p. 89-98, 2002.

PESTER, M. et al. The Thaumarchaeota: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 14, n. 3, p. 300-306, 2011.

PYLRO, V.S. et al. BMPOS: a flexible and user-friendly tool sets for microbiome studies. **Microbial Ecology**, New York, v. 72, n. 2, p. 443-447, 2016.

QUINTAES, B.R. et al. Avaliação de comunidades microbianas em lixiviado de aterro de resíduos sólidos urbanos – revisão. **Revista de Ciência e Tecnologia**, Campinas, v. 12, p. 7-19, 2012.

RAHMAN, M.T. et al. Environmental distribution and abundance of the facultative methanotroph *Methylocella*. **The ISME Journal**, London, v. 5, n. 6, p. 1061-1066, 2011.

RODRIGUES, J.L.M. et al. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 110, n. 3, p. 988–93, 2013.

ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F. Utilização de eletroforese em gel com gradientes de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura para estudar a diversidade microbiana. In: MELLO, I.S. (Ed.). **Genética e melhoramento de microrganismos**. São Paulo: EDUSP, 2002.

SANGER, F. et al. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS, A.L. **Diversidade molecular microbiana de lixiviados de aterros**. 2010. 98 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

SANTOS, A.L. et al. New approaches to understanding microbial diversity in wastewater, landfills and leachate treatment. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 4, p. 631-648, 2009.

SAWAKUCHI, H.O. et al. Oxidative mitigation of aquatic methane emissions in large Amazonian rivers. **Global Change Biology**, Oxford, v. 22, n. 3, p. 1075-1085, 2016.

SCAVINO, A.F. et al. Structure and function of the methanogenic microbial communities in Uruguayan soils shifted between pasture and irrigated rice fields. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 15, n. 9, p. 2588-2602, 2013.

SCHLOSS, P.D. et al. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 12, p. e27310, 2011.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 71, n. 3, p. 1501-1506, 2005.

SCHÖNGART, J.; WITTMANN, F.; WORBES, M. Biomass and net primary production of Central Amazonian floodplain forests. In: JUNK, W.J. et al. (Ed.). **Amazonian Floodplain Forests: Ecophysiology, biodiversity and sustainable management**. Heidelberg: Springer, 2010. cap. 18, p. 347-388.

SEMRAU, J.D.; et al. Methanotrophs and copper. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 34, n. 4, p. 496-531, 2010.

SERRANO-SILVA, N. et al. Methanogenesis and methanotrophy in soil: A review. **Pedosphere**, Amsterdam, v. 24, n. 3, p. 291-307, 2014.

SILVER, W.L. et al. Effects of soil texture on belowground carbon and nutrient storage in a lowland Amazonian forest ecosystem. **Ecosystems**, Brooklyn, v. 3, n. 2, p. 193-209, 2000.

SIOLI, H. Über Natur und Mensch im brasilianischen Amazonasgebiet. **Erdkunde**, Bonn, v. 10, n. 2, p. 89-109, 1956.

SOKAL, R.R. The principles and practice of numerical taxonomy. **Taxon**, Utrecht, v. 12, n.5, p. 190-199, 1963.

STAHL, D.A.; AMMAN, R.A. Development and Application of Nucleic Acid Probes in Bacterial Systematics. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. Chichester: John Wiley & Sons, 1991. p. 205-248.

STEINBERG, L.M.; REGAN, J.M. Phylogenetic Comparison of the Methanogenic Communities from an Acidic, Oligotrophic Fen and an Anaerobic Digester Treating Municipal Wastewater Sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 74, n. 21, p. 6663–6671, 2008.

THAUER, R.K.; SHIMA, S. Methane as fuel for anaerobic microorganisms. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1125, n. 1, p. 158-170, 2008.

TORRES-ALVARADO, R. et al. Methanogenesis and methane oxidation in wetlands. Implications in the global carbon cycle *Metanogénesis y metano-oxidación en humedales. Implicaciones en el ciclo del carbono global*. **Hidrobiológica**, México, DF, v. 15, n. 3, p. 327-349, 2005.

VETRIANI, C. et al. Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic archaea in deep-sea sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 65, n. 10, p. 4375-4384, 1999.

VITZTHUM, F. et al. A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR Green I and a standard ultraviolet transilluminator gel imaging system. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 276, n. 1, p. 59-64, 1999.

VOROBÉV, A.V. et al. *Methyloferula stellata* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, obligately methanotrophic bacterium that possesses only a soluble methane monooxygenase. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 61, n. 10, p. 2456-2463, 2011.

WANG, Q. et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 73, n. 16, p. 5261-5267, 2007.

- WANG, Z.P. et al. Methane emission and entrapment in flooded rice soils as affected by soil properties. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 16, n. 3, p. 163-168, 1993.
- WATANABE, T.; KIMURA, M.; ASAKAWA, S. Community structure of methanogenic archaea in paddy field soil under double cropping (rice-wheat). **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 38, n. 6, p. 1264-1274, 2006.
- WATANABE, T.; KIMURA, M.; ASAKAWA, S. Distinct members of a stable methanogenic archaeal community transcribe *mcrA* genes under flooded and drained conditions in Japanese paddy field soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 41, n. 2, p. 276-285, 2009.
- WATANABE, T.; KIMURA, M.; ASAKAWA, S. Dynamics of methanogenic archaeal communities based on rRNA analysis and their relation to methanogenic activity in Japanese paddy field soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 39, n. 11, p. 2877-2887, 2007.
- WHALEN, S.C. Biogeochemistry of methane exchange between natural wetlands and the atmosphere. **Environmental Engineering Science**, Larchmont, v. 22, n. 1, p. 73-94, 2005.
- WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, Washington, DC, v. 51, n. 2, p. 221, 1987.
- WOESE, C.R. et al. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 87, n. 12, p. 4576-4579, 1990.
- YE, L.; ZHANG, T.; WANG, T.; FANG, Z. Microbial structures, functions, and metabolic pathways in wastewater treatment bioreactors revealed using high-throughput sequencing. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 46, p. 13244-13252, 2012.
- YU, Y. et al. Analysis of community structures in anaerobic processes using a quantitative real-time PCR method. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 52, n. 1-2, p. 85-91, 2005.
- ZAK, J.C. et al. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 26, n. 9, p. 1101-1108, 1994.
- ZHANG, T.; FANG, H.H.P. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 70, n. 3, p. 281-289, 2006.
- ZILLI, J. E. et al. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Brasília, DF, v. 20, n. 3, p. 391-411, 2003.
- ZINDER, S.H. Methanogens. In: BURLAGE, R.S. et al. (Ed.). **Techniques in microbial ecology**. New York: Oxford University Press, 1998. p. 113-136.